



Universidad Autónoma del Estado de Morelos

Facultad de Farmacia

“Comparación de la expresión y secreción de Il-1B, Il-6 y TNF en
células THP infectadas por virus Dengue”

Tesis

Para obtener el título de
Licenciado en Farmacia

Presenta

Flores Domínguez Shakespeare Tonatiuh

Co-directora de tesis

Dra. Judith González Christen

Co-director de tesis

Dr. Tomás Javier Serrato Salas

Cuernavaca, Morelos

Octubre 2021



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE FARMACIA
SECRETARIA DE DOCENCIA
JEFATURA DE LA LICENCIATURA

Fecha: 09 de septiembre de 2021
Asunto: VOTOS APROBATORIOS
Medio de Notificación: Electrónica
Folio: FF/D/SD/JLF/0113/2021

DRA. DULCE MARIA ARIAS ATAIDE
DIRECTORA DE SERVICIOS ESCOLARES
U.A.E.M
PRESENTE

Los suscritos catedráticos de la Facultad de Farmacia, dependiente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, se dirigen a Usted con el fin de comunicarle que, después de haber revisado el trabajo de tesis **“Comparación de la expresión y secreción de Il-1B, Il-6 y TNF en células THP infectadas por virus de Dengue”** presentada por el pasante de la carrera de Licenciado en Farmacia. **C. Shakespeare Tonatiuh Flores Domínguez, (20171007821)**, consideramos que reúne todos los requisitos que exige un trabajo de esta especie, por lo que hacemos saber nuestro **VOTO APROBATORIO**.

Jurado

Firma

Dr. José Luis Montiel Hernández

Dra. Hilda Rangel Flores

Dra. Carolina Bustos Rivera Bahena

Dr. Erik Ayala Calvillo

Dra. Roberta Salinas Marin



ATENTAMENTE
“POR UNA HUMANIDAD CULTA”

M.P.D. Reyna América Serrano López
Secretaria de Docencia

Cp Archivo
Cp. Bdm

Av. Universidad 1001 Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, México.
C.P. 62210 Tel. 777 329 7000 Ext. 3365



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

REYNA AMERICA SERRANO LOPEZ | Fecha:2021-09-09 10:20:00 | Firmante

QVMb4YkbJUygiPWA52Qr5ftam2uDMD5x3KbtXeNGcVqXnV4AGcNAH5zCjFVRyMSiwuXViXCcRnr1mHv43UIESBddwI7DTv8wNTh4hqK8vTCXJWYlvknTsazzDFtoVJcKq/pB
EmT6oilorNcRxOvO+3oL6Hiv9bA1xiZI35GcN5hJ0CDxtqGKeh8en33diXrso2vrGbcu59kk4iTKfOq74XFQRkr3fN6ZXG3iPKUozK6wAOt84tZNISJb4qzw3l8Wwsv34YT2cLh7VI7h
zj2luLWD03h5NAYDKDebfVol2Fz0j449A6aDSH0VDRO3S2nr8FAL/QJf7Q0SY8Zbx/QQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[sp6iqD](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/MKN5PgsJYr7mBnv8tBW1IzYdYAoUOYUa>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

ERICK AYALA CALVILLO | Fecha:2021-09-10 21:38:20 | Firmante

boSR/Zun6snlHK5AuTGaQDzf5hBNS6AVnnNKcgGDsCx1AxKFn8aBJU4Cn0Pqv+OcaLh59IMnPJl+nRf1tmUsnR+PdN2VR7RoB+MM+bygFJHHUVsgC6NT6AOCmui+CeQnlsLi
elGI+dl6JS3unwPUMiL9i3jx3SLsvC63mRvzA0+aKLMdi96phXOwfF4lqmMbDlyXiozl+VlOLssFjpYi03tq+6EfeceqVeh6tRNDUiXMXGz7rcO3rx1ePsvUkK250VBZ15dWG/S2GX
BIM86imAHN5NHVrYgWlmpVrHf0yLpvaCmlX6w45TZpxgAMBB283GtFNG2xmCQsQOwiaBDw==

HILDA RANGEL FLORES | Fecha:2021-09-11 19:26:06 | Firmante

Ar6tuEVFE1XUssdNEexavZrFjTKmFIVL6nRhyHPGi/LMrDs0xtR6nnHRnrrHNYQs80isEFd5N4GGV4sy/gP3Kic0qNAGEfMfa1if9rNwDy+y8Sph68TCjIqoBz1dX67GAjnv6sCJsR
TRDoelF5C1+vC2LwaHl2prH1CLw6Qn1CnJlrc60P+BqD+IOszof5wCo3W/9DRl5utklLBAm3gqYERzCi+XusefMJlNpUaDAAUNoXALaqlGXUJSXDCrOb53EDtN7e8An/+MKXO8+
L7W1iizSf7sLPtt9qtGP3m4RwRsrHizlbd8cBSq1uqXBO+muxGuENlqK5OYzpdYcLkw==

JOSE LUIS MONTIEL HERNANDEZ | Fecha:2021-09-11 19:29:41 | Firmante

Mfmu5Xw/gtQ8QmL4dMK5NKNJMD9fD0mSM05NzSRIYGUCQBtAfLHZHvrTYQGisTYgO8Z8BAk1qwlAKvHNvw8f8XVh/ln2SiCaQZlZ7y1TjvhFSequky4IGQZhbZlco/FeWH4X
2XY8BITOC2aB0Ljvvoj7PYwfaX1t1yVaZHyZ6NTRWg2TNFH4TRvT/AU9urRFA0HPfOpXzhVhvrI0tSjmlNpd+kFQBACNVAjElq5/CwdeiYhf3E3+Tz/hEbitQ1zZWR05FmV5aX+j
Czx6+I907gi9MTkmXpBf/f05XCL5CoHsRN8Cx3LsflpqRvJZ/KrB4Xl0xuQdd/RvwUg==

ROBERTA SALINAS MARIN | Fecha:2021-09-13 15:43:56 | Firmante

Mjd9/hFmxAwJ6PIQ09pdbi/31Xsny+/MZwsSgfnQjekBV1kMkGwrLKYFfhuVFBhKMGrbENrfcdy3Fh5Usv0CEOefmLGHYbwqPhCs+HTJXgGnV9bihBlzQMclMfmLWkRBEInhvPU
MTRRMSlwCJOx8VJCj+X4VfotPO72aK3M+j18XY3Q9Cvp3CEfhyUnJ49FIWR0XFSCf41f1tINP65GY4CfG4BZvYca1c2t4laYMtnqJv29tJ/MuwhVtybu4WntmQx/s0zag0lp9OUoQ
4VAZGVspDxUhNdYc5cFGiHdy/UkHrcioSSCtphTl2FKr2+fXhJ14xooRGNNgW1XxphA==

CAROLINA BUSTOS RIVERA BAHENA | Fecha:2021-09-17 15:05:27 | Firmante

JQpvdffMAnkCWWh4k6q127051Deqpc2k3AD0mDk1+/CavVziYd/mEOSrf02EIMQzVPHKEbZIZDBLwVhCITE6fZA+Cjv80taXjX7Tbn1GsgGURUw5oQr2sSm8YKE9KvG/KW3iDnbg
NXgDvVeGyd0QlyOm6XVY6abolZOD309qaA7XaXmPFAzfl/utM7k2VNsWYR4xDFIKCV8DkqDrRcG8teRzSyaHOl0qqhTvHwnXl5eHqazF+YPPNKzG+z0W20Nmh7x75ykKFuzH
lptnLpZ7DDUEzPH8IY96eUx8mbrHnav76hk3Ex3rH+z2NPMcfYfizTpHNuMx2kuzvLxAPm+YAog==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



uUxkto

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/9crIEW4p9ITzapBTK6UCYlepYrd2T90d>



Agradecimientos

A la Dra. Judith González Christen. Por recibirme en el laboratorio, por darme todas las herramientas para sacar adelante los experimentos, por la confianza que puso en mí y apoyarme hasta el último momento para sacar adelante esta tesis, aunque sé que ha sido un camino largo, gracias por su enseñanza, consejos, por su paciencia para dirigir este proyecto, y sobre todo por escucharme y todos los momentos de alegría en el laboratorio.

Dr. Javier Serrato. Por apoyarme para poder sacar adelante mis experimentos, por tus aportes, por tus consejos para mejorar y por ser un buen co-tutor, y los momentos de convivencia.

Dr. José Luis Montiel. Gracias por su apoyo durante mi estancia en el laboratorio, por sus enseñanzas, por sus consejos y sugerencias para el mejoramiento de la tesis.

A los miembros del jurado. Por sus correcciones, comentarios y asesoría en este proyecto de investigación.

A mis amigos universitarios. Son muchos, pero en especial a Héctor, Jorge y Daniel, por ser parte de esta bonita etapa, por estar en los momentos de relajación y diversión, pero sobre todo en los momentos que teníamos que ponernos a estudiar para salvar el semestre.

Mi hermano. Gracias por compartir tu vida conmigo, y por todo tu apoyo.

A mi tía Edith, tío Memo y Eury. Por siempre apoyarnos y estar con nosotros en las buenas y en las malas. Por todos sus detalles, sus consejos y porque siempre han estado ahí cuando es necesario.

A toda mi familia. Tías, tíos, primas, primos, gracias porque todos han sido un ejemplo, gracias por todo el apoyo, por sus consejos, regaños y su compañía.

A la Facultad de Farmacia. Por brindarme los conocimientos, equipo necesario para desarrollarme y ser el soporte para el desarrollo de este proyecto de investigación.

Dedicatoria

A MIS PADRES. Por brindarme su apoyo durante todos estos años de estudio, por estar pendiente de lo que necesitara para terminar la licenciatura.

Mamá gracias por todo tu amor, por siempre estar ahí cuando lo he necesitado, por todos los sacrificios que has hecho por mí, y por tus consejos.

Papá gracias por tu trabajo, por todo tu esfuerzo para estar presente aun estando lejos, por estar siempre pendiente de lo que necesitara.

Por ser ambos un ejemplo de querer salir adelante. Porque hoy todos sus regaños, enseñanzas, y guía han dado frutos.

Muchas gracias por que este logro es de ustedes y espero vivan muchos años más para festejar muchos logros juntos.

A mis abuelitos. Daniel y Guadalupe, aunque hoy ya no están aquí, gracias por su ejemplo, por consentirme y lo más importante gracias a su educación y enseñanza soy la persona que hoy soy.

Tabla de contenido

INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. HISTORIA Y EPIDEMIOLOGIA.....	4
1.2. AGENTE ETIOLÓGICO.....	14
1.2.1. GENERALIDADES Y ESTRUCTURA DEL VIRUS DENGUE.....	14
1.2.2. SEROTIPOS Y GENOTIPOS DEL DENV.....	17
1.3. MANIFESTACIONES DEL DENGUE.....	18
1.3.1 DEFINICIÓN DE LOS CASOS DE DENGUE CON Y SIN SÍNTOMAS DE ALARMA, Y DENGUE GRAVE.....	19
1.4.1. FACTORES VIRALES.....	24
1.4.2 FACTORES ASOCIADOS AL HOSPEDERO.....	25
1.4.3. Respuesta potenciada mediada por anticuerpos (ADE, antibody dependent enhancement).....	25
1.4.4. TORMENTA DE CITOCINAS.....	26
1.5. MACRÓFAGOS Y SU PAPEL EN LA INFLAMACIÓN.....	28
2. ANTECEDENTES.....	32
3. JUSTIFICACIÓN.....	35
4. HIPÓTESIS.....	36
5. OBJETIVOS.....	36
5.1. OBJETIVO GENERAL.....	36
5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
6.1. CULTIVO CELULAR.....	37
6.2. DIFERENCIACIÓN DE LÍNEA CELULAR CON PMA.....	37
6.3. DENV-2 CEPA NUEVA GUINEA.....	37
6.4. INFECCIÓN DE CÉLULAS THP-1 CON DENV-2.....	37
6.5. TRATAMIENTO CON LPS COMO CONTROL POSITIVO DE ESTIMULACIÓN... 38	
6.6. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE CITOCINAS.....	38
6.7. DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE TNF, IL-6 E IL-1β, POR RT-PCR.....	40
6.8. DETECCIÓN DE LA INFECCIÓN POR RT-PCR.....	43
7. RESULTADOS.....	45

7.1. INFECCIÓN DE CÉLULAS THP-1 POR DENV2.....	45
7.2. EXPRESIÓN DE RNA PARA IL-1β, IL-6 Y TNF EN CÉLULAS INFECTADAS POR DENV2.	46
7.2.2. EXPRESIÓN DE TNF Y NORMALIZACIÓN DE TNF/ β-ACTINA.	48
7.2.4. EXPRESIÓN DE IL-β Y NORMALIZACIÓN DE IL-β/ β-ACTINA.	52
7.3. CUANTIFICACIÓN DE LA SECRECIÓN DE IL-1β, IL-6 Y TNF.....	54
7.3.1. NIVELES DE SECRECIÓN DE IL-6.	54
7.3.2. NIVELES DE SECRECIÓN DE IL-1β.....	56
7.3.3. NIVELES DE SECRECIÓN DE TNF.....	57
8. DISCUSIÓN.....	59
9. CONCLUSIÓN.	63
10. PERSPECTIVAS.	64
11. BIBLIOGRAFÍA.	65

Índice de figuras.

Figura 1. Cambios del número de casos de dengue y de países afectados en el continente americano desde 1980 hasta el 2020. Tomado de OPS 2021

Figura 2. Número de casos confirmados de Dengue en México, de 1993 a 2020.

Figura 3. Distribución de los casos de Dengue en México de acuerdo al grupo de edad del 2018 al 2020.

Figura 4. Número de casos por semana de dengue probable y confirmado, en México durante 2017 y 2018.

Figura 5. Esquema que describe la estructura del Virus Dengue, mostrando la localización y organización de las proteínas estructurales, así como el ARN viral.

Figura 6. Esquema que representa la organización del genoma del virus del dengue, así como la localización de las proteínas en la membrana del RE, durante la transcripción.

Figura 7. Expresión del RNA viral a diferentes tiempos de infección.

Figura 8. Análisis de los productos obtenidos de RT-PCR, para determinar la expresión de TNF, IL-1 β e IL-6.

Figura 9. Gráfica de expresión de β -actina en las diferentes muestras y tiempos en que se realizó en el ensayo.

Figura 10. Expresión relativa de TNF en los 3 diferentes tiempos (24, 48 y 72 hrs) y tratamientos (mock, LPS e infección con DENV2).

Figura 11. Expresión relativa de IL-6 en los 3 diferentes tiempos (24, 48 y 72 hrs) y tratamientos (mock, LPS e infección con DENV2).

Figura 12. Expresión relativa de IL-1 β en los 3 diferentes tiempos (24, 48 y 72 hrs) y tratamientos (mock, LPS e infección con DENV2).

Figura 13. Determinación de los niveles de IL-6 secretada en células tratadas con LPS o infectadas con DENV durante 24, 48, 72 y 96.

Figura 14. Determinación de los niveles de IL-1 β secretada en células tratadas con LPS o infectadas con DENV durante 24, 48, 72 y 96.

Figura 15. Determinación de los niveles de TNF secretada en células tratadas con LPS o infectadas con DENV durante 24, 48, 72 y 96.

Índice de tablas.

Tabla 1. Cambios en las muertes por Dengue de 2010 a 2017 y su efecto sobre la esperanza de vida.

Tabla 2. Número de casos confirmados de dengue y dengue severo, mortalidad e incidencia de Dengue en América 2011- 2017.

Tabla 3. Datos sobre el número de casos de Dengue por entidad federativa en México, durante el 2018 y 2019

Tabla 4. Incidencia de los casos de Dengue no grave, dengue con síntomas de alarma y dengue grave en el estado de Morelos durante 2019

Tabla 5. Clasificación modificada de la definición sintomática del dengue, OPS/OMS.

Tabla 6. Reactivos y cantidades para la síntesis de cDNA.

Tabla 7. Condiciones para la síntesis de cDNA

Tabla 8. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados en RT-PCR

Tabla 9. Reactivos y cantidad utilizadas para realizar el RT- PCR

Tabla 10. Condiciones de amplificación para el PCR de IL-1 β , TNF e IL-6.

Tabla 11. Secuencia de oligonucleótidos utilizados en la determinación de infección por DENV-2 en células THP-1 diferenciadas.

Tabla 12. Condiciones de amplificación para determinar infección POR DENV-2.

INTRODUCCIÓN.

El virus del Dengue (DENV, acrónimo oficial) es el agente causal de la enfermedad conocida como Dengue, que es la principal enfermedad viral transmitida por artrópodos en el mundo. Esta enfermedad re-emergente se encuentra distribuida en 112 países tropicales y subtropicales del mundo (Restrepo B.N et al., 2010). Es una virosis que genera pandemias, la cual se está propagando rápidamente en muchas regiones del mundo. Asimismo, prospera en zonas urbanas pobres, suburbios y zonas rurales, aunque también afecta a barrios más acomodados de países tropicales y subtropicales (WHO, 2017).

El DENV pertenece al género *Flavivirus* de la familia *Flaviviridae*. Existen 4 serotipos distintos, pero estrechamente emparentados, que se denominan: DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4. La infección con cualquiera de ellos puede conducir a una variedad de manifestaciones, desde una infección asintomática o subclínica hasta la fiebre clásica del dengue (FD). En la actualidad la Organización Mundial de la Salud (OMS), y la Organización Panamericana de la Salud (OPS), lo clasifican en dengue leve cuando se presenta como fiebre elevada (40° C) acompañada de dos de los síntomas siguientes: dolor de cabeza muy intenso, dolor detrás de los globos oculares, dolores musculares y articulares, náuseas, vómitos, agrandamiento de ganglios linfáticos o sarpullido. Define a dengue grave, a aquellos pacientes que además cursan con extravasación de plasma, acumulación de líquidos, dificultad respiratoria, hemorragias graves o falla orgánica (WHO, 2017).

El Dengue se transmite por la picadura de mosquitos hembra, principalmente de la especie *Aedes aegypti* y, en menor grado, de *A. albopictus* (WHO, 2017). La transmisión del DENV entre humanos y mosquitos se presenta cuando el mosquito se alimenta con la sangre de un individuo virémico (Velandia M, 2011). Tras un periodo de incubación del virus que dura entre 4 a 10 días, un mosquito infectado puede transmitir el agente patógeno durante toda su vida (WHO 2017). Al picar a una persona sana, luego de cuatro o cinco días, el paciente desarrolla fiebre y

dolores generalizados (Velandia M, 2011). Tras la aparición de los primeros síntomas, las personas infectadas con el virus pueden transmitir la infección (durante 4 a 5 días; 12 días como máximo) a otros mosquitos no infectados (WHO 2009).

Varios grupos de investigación se han dado a la tarea de comprender el mecanismo por los cuales los pacientes con formas leves de la enfermedad por dengue evolucionan a las formas graves, a pesar de esta intensa investigación, la patogenia de DENV aún no se comprende completamente.

El desarrollo de las formas severas del dengue ha sido explicado mediante diferentes hipótesis. Una es el aumento de la infección dependiente de anticuerpos o potenciación mediada por anticuerpos (antibody dependent enhancement [ADE], en inglés), propiciada por infección secundaria con un serotipo diferente (Castro M, 2013).

Otra hipótesis sugiere que las formas severas están relacionadas con el tipo de virus. Se ha descrito que las formas severas del Dengue están relacionadas con la virulencia de la cepa y con el serotipo circulante.

Adicionalmente se reconoce que las características del hospedero son también determinantes de las formas clínicas de la enfermedad debido a la susceptibilidad hacia las formas severas del Dengue, dependiendo del origen étnico de los pacientes (Restrepo B. et al., 2010).

Por otro lado, se ha mostrado que la producción de citocinas, como respuesta inmune celular a la infección por el virus del dengue, tiene un papel importante en las manifestaciones de la enfermedad (Restrepo B. et al., 2010).

Los macrófagos son una de las principales células diana de la infección por DENV y desempeñan un papel importante en la patogénesis, ya que se sabe que producen varias citocinas inflamatorias que pueden conducir a disfunción endotelial y, por lo tanto, a fugas vasculares (Castillo J, 2018).

Por esta razón es de suma importancia esclarecer el papel de los macrófagos y de las citocinas pro-inflamatorias en la patogenia del dengue, por lo cual en este trabajo

evaluaremos tanto los niveles expresión como de secreción de dichas citocinas en un modelo de macrófagos pro-inflamatorios.

1. MARCO TEÓRICO.

1.1. HISTORIA Y EPIDEMIOLOGIA.

No se tiene registro exacto de cuándo fue la primera aparición del virus Dengue en la humanidad, sin embargo, a finales del siglo XVIII una epidemia con una fuerte similitud con Dengue ocurrió en Asia y América. Asimismo, se propone que entre los siglos XIX y XX el virus se extendió por los trópicos y sub-trópicos, ocasionando frecuentes epidemias (Souza T, 2018 y González J, 2014).

En el continente americano las epidemias por virus dengue fueron estudiadas por Brathwaite et. al, quienes realizaron un historial desde 1600 hasta el 2010 clasificando este periodo en cuatro etapas: la introducción del dengue en América (1600-1946), plan continental para la erradicación del vector, *A. Aegypti*, (1947-1970) en el cual se logró con éxito la erradicación del mosquito en 18 países del continente, re-infestación de *A. aegypti* (1971-1999) causada por el fracaso en el programa de erradicación y el incremento de la dispersión y la circulación del DENV (2000-2010) que se ha caracterizado por el incremento del número de brotes actuales (Brathwaite O, 2012).

El dengue grave (conocido anteriormente como dengue hemorrágico) fue descrito por vez primera en los años cincuenta del siglo pasado durante una epidemia en Filipinas y Tailandia y, de acuerdo con la OMS, antes de 1970, solo nueve países habían sufrido epidemias de este tipo de dengue (WHO, 2017). De acuerdo con estimaciones recientes, en las últimas décadas ha aumentado enormemente la incidencia de dengue en el mundo. El número real de casos está insuficientemente notificado y muchos casos están mal clasificados. A pesar de ello, la OMS reporta que cada año, unas 500 000 personas que padecen dengue grave necesitan hospitalización, de los cuales la gran mayoría son niños y aproximadamente un 2,5% fallecen. Además, se estima que se producen 390 millones de infecciones por dengue cada año, de los cuales 96 mil se manifiestan clínicamente (Brady O, 2012).

Actualmente, la enfermedad es endémica en más de 100 países de las regiones del Mediterráneo Oriental, África, América, Asia Sudoriental y el Pacífico Occidental,

siendo las últimas tres regiones las más afectadas. Globalmente el número total de casos de dengue reportados a la OMS ha tenido una impresionante expansión, con cambios de cerca de 105 000 reportados en 1990, de 505,430 en el 2000, con cerca de 2.4 millones en el 2010 y la cifra récord de 4.2 millones en el 2019 (Zeng Z et al., 2021). Hay que notar que estos datos se refieren a casos confirmados clínicamente por dengue, por lo que la tasa de infección real es mucho mayor.

De los 4.2 millones reportados en el 2019, el continente americano reportó por sí solo 3.139.335 casos de dengue lo que representa un incremento del 30% con respecto al 2015 y convierte a esta región como la más afectada mundialmente (OPS/ OMS, 2020)

El dengue se ha convertido en una de las causas principales de hospitalización y muerte en los niños y adultos de dichas regiones (Bhatt O, 2013). Específicamente, a nivel mundial en la última década se reportó un incremento de muertes por dengue del 65.5%, donde pasó de 24,500 en 2007 a 40,500 en 2017, con un incremento de igual manera en la tasa de mortalidad del 40.7%, pasando de 0.4 a 0.5 muertes por cada 100 000 habitantes según lo reportado por Global Health Metrics (GBR, 2018) siendo una de las enfermedades que no vieron una disminución en este periodo y que contribuyen a la pérdida de años de esperanza de vida, como se observa en la Tabla 1.

Tabla 1. Cambios en las muertes por Dengue de 2010 a 2017 y su efecto sobre la esperanza de vida. Tomada de GBR 2018

	All-age deaths (thousands)		Age-standardised death rate (per 100 000)		All-age YLLs (thousands)		Age-standardised YLL rate (per 100 000)	
	2017	Percentage change, 2007-17	2017	Percentage change, 2007-17	2017	Percentage change, 2007-17	2017	Percentage change, 2007-17
Dengue	40.5 (17.6 to 49.8)	65.5% (21.7 to 99.7)*	0.5 (0.2 to 0.7)	40.7% (3.6 to 69.7)*	1902.9 (716.6 to 2312.9)	32.0% (-1.8 to 61.2)	26.1 (9.8 to 31.7)	18.2% (-12.0 to 45.0)

En América, al igual que en el resto del mundo, se registró un incremento en el número de casos por dengue pasando de 1 millón en la década de 1990 a 4.7 millones en el periodo del 2000- 2007, como se observa en la Figura 1. (Souza T, 2018). Y a partir del 2011, el número de casos, defunciones y tasa de mortalidad por dengue ha tenido una tendencia a incrementar año tras año, con excepción del 2017, que ha sido el año con menor índice de estos en la última década como se describe en la Tabla 2. Sin embargo, durante el 2019 el panorama cambió completamente, presentándose el mayor número de casos de dengue reportados globalmente hasta esa fecha. Por ejemplo, en el sureste asiático hubo un incremento del 46% comparado con el 2015 (Mohamed M. 2021), mientras que para la región americana representó uno de los peores años, con más de 3 millones de casos, siendo mayor que los reportados en el continente asiático. En este año incluso se registró por primera vez la transmisión de esta enfermedad en Afganistán (WHO 2020).

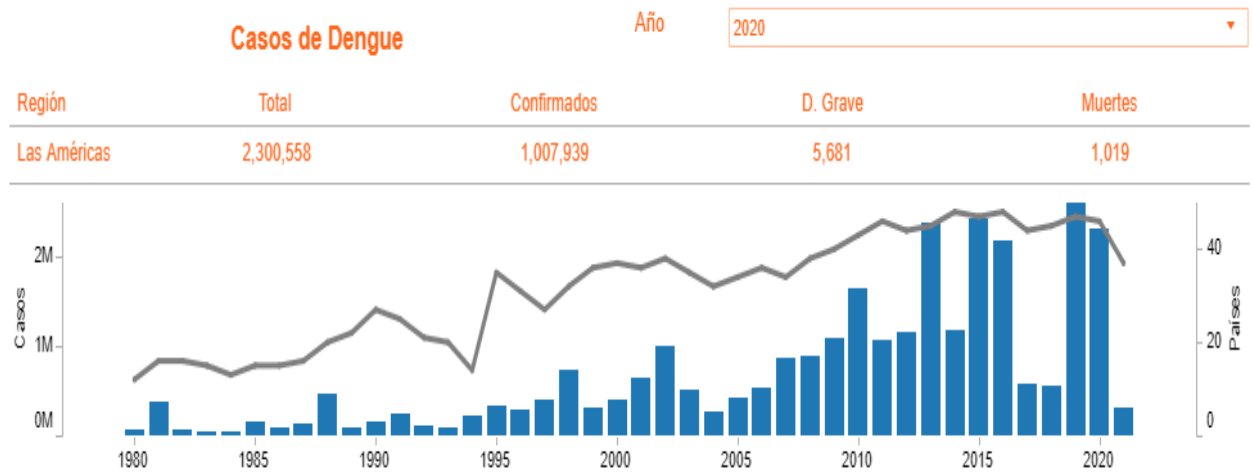


Figura 1. Cambios del número de casos de dengue y de países afectados en el continente americano desde 1980 hasta el 2020. Tomado de OPS 2021

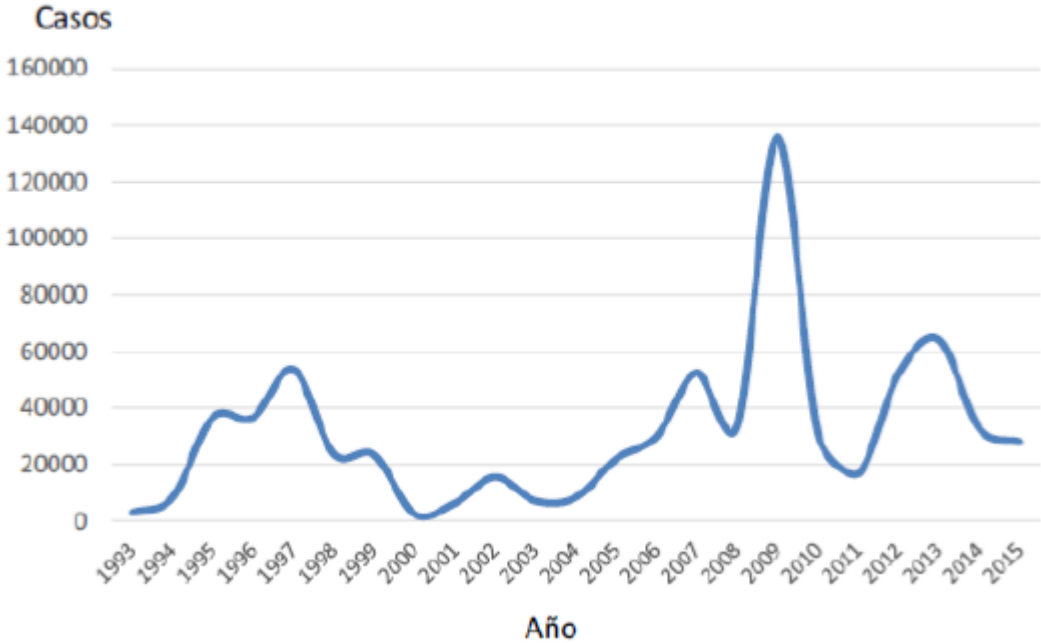
Tabla 2. Número de casos confirmados de dengue y dengue severo, mortalidad e incidencia de Dengue en América. Datos tomados de Salles et al. 2018.

	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017
casos de dengue	1,079,978	1,162,998	2,384,234	1,171,029	2,430,178	2,168,146	577,697
casos severos por dengue	19,450	32,408	37.692	15,744	12,824	4,366	4,366
muerteras	758	807	1,403	803	1,354	903	903
tasa de incidencia/ 100 000 habitantes	113	120.7	245	194	245	219	58.02

El dengue en México es la enfermedad viral transmitida por vector de mayor importancia, hay diversos factores que favorecen su presencia: la circulación viral cíclica de los cuatro serotipos, altas densidades vectoriales, fenómenos asociados al cambio climático como los cambios en la intensidad y duración de la temporada de lluvias y frecuencia de huracanes (SSA 2017). En México se tienen registros de infecciones con virus dengue desde 1941, año en el cual se registraron 6, 955 casos, dicha cifra fue disminuyendo a medida que avanzaba la erradicación del vector, certificada en 1963. Para 1978, después de haber sido erradicado el mosquito durante 12 años, éste reingresó a México por Tapachula, y se diseminó por el territorio en menos de 10 años, hasta afectar 29 entidades federativas (Narro R, 1995). El dengue se convirtió en un problema de salud pública donde la población en riesgo era la carente de servicios básicos en salud, y la incidencia era predominante en la población adulta. A partir de 1980 y hasta 2011 se han generado tres picos de la enfermedad, cada uno de aproximadamente 10 años, en los cuales se observó, por lo menos, un brote importante por cada década (Torres I, 2014).

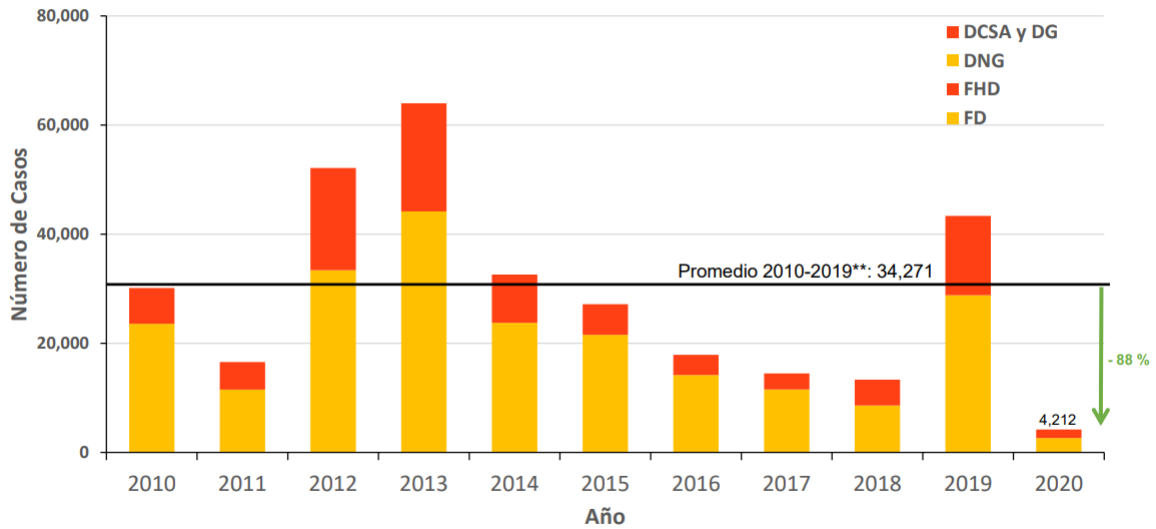
Sin embargo, este patrón ha cambiado, y ahora los periodos entre una epidemia y la siguiente es de 5 años, o menor. Como se puede observar en la Figura 2A en el periodo del 2000 al 2015 se había tenido una tendencia ascendente hasta el año 2009 posterior a este se ha presentado una alternancia en el incremento y decremento hasta el 2015. Con excepción de Aguascalientes, Ciudad de México y Tlaxcala el resto de las entidades han notificado casos autóctonos de dengue (SSA, 2017). Sin embargo, del 2015 al 2020 nuevamente vemos un incremento notorio en 2019, correspondiente a este periodo de 4 a 5 años Figura 2B (SSA 2020). Las cifras del 2020 fueron mucho menores que para el 2019, ya sea porque corresponden a este periodo de disminución en la transmisión, o debido a las restricciones de movilidad por la pandemia de COVID-19, e incluso hasta mayo de 2021 los casos han sido todavía mucho menores (SSA 2021).

Casos Confirmados de Dengue. México, 1993-2015



FUENTE: SINAVE/DGE/SS. Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Dengue

MÉXICO, DENGUE: Casos Confirmados de Dengue por Clasificación, 2010-2020*



Fuente: SINAVE/DGE/SALUD/Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Dengue. *A la semana 25.
 Nota: Para los años 2010 a 2015 los casos de FD equivalen clínicamente a DNG y los casos de FHD a los casos de DCSA y DG.

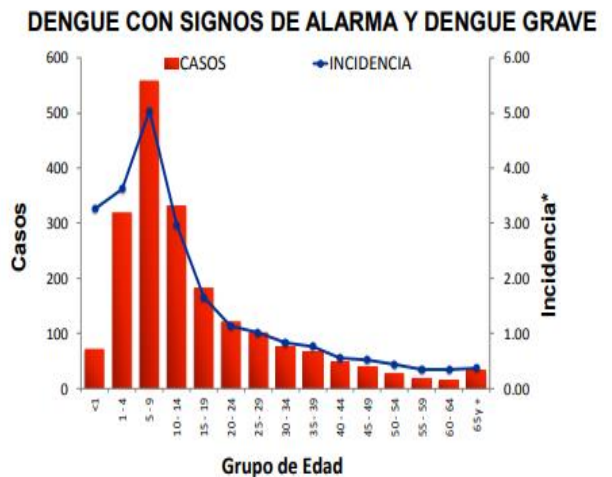
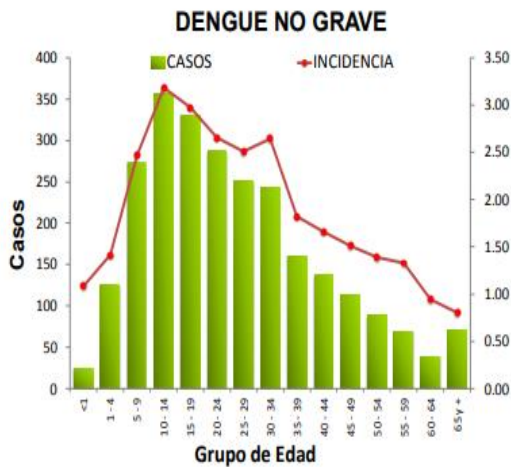
Figura 2 A) Número de casos confirmados de Dengue de 1993 a 2015. 2 B) Número de casos confirmados de Dengue en México del 2010 al 2020. Tomado de Lineamiento de vacunación contra Dengue, SSA, 2017 y Panorama Nacional de Dengue 2020.

Como ya se mencionó anteriormente en México se han observado cambios en la población afectada, durante la década de 1990-1999 la mayor tasa de incidencia se encontraba en la población de 25 a 44 años, con una tasa promedio anual de 30.7, mientras que en la década de 2000-2009 la tasa de incidencia más alta se desplazó hacia la población de 15 a 24 años, con una tasa promedio anual de 51.3 Actualmente en el 2018, 2019 y 2020, el rango de edad de la población que se ve afectada por dengue no grave, va desde menos de un año hasta adultos mayores de 65 años, sin embargo la mayor incidencia de los casos se encuentran en la población de los 5 a los 35 años. Sin embargo, la presencia de signos de alarma y

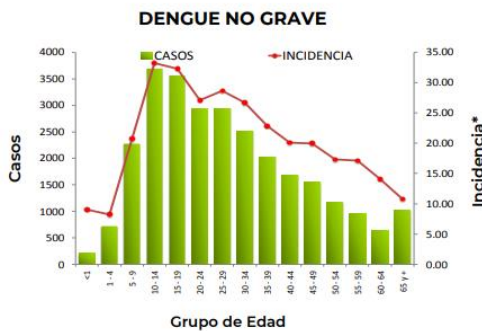
el desarrollo de dengue grave está afectando principalmente a los menores de 15 años. Figura 3



Casos e Incidencia de Casos Confirmados de Dengue por Grupo de Edad y Género. México, 2018.



Casos e Incidencia de Casos Confirmados de Dengue por Grupo de Edad y Género; México, 2019.



Casos e Incidencia de Casos Confirmados de Dengue por Grupo de Edad y Género; México, 2020.

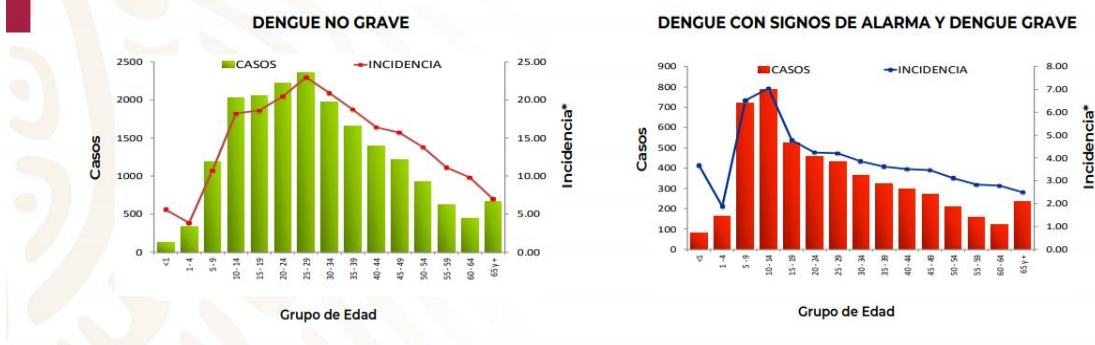


Figura 3. Distribución de los casos de Dengue en México de acuerdo al grupo de edad A) 2018, B) 2019 C) Tomado de Panorama epidemiológico de dengue 2018, 2019 y 2020 SSA.

Por otro lado, entre 2018 y 2019 el estado de Morelos se encuentra entre las 8 entidades con mayor índice de casos por dengue en el país, incluso mayor que Yucatán, en donde el dengue es endémico desde hace décadas (Tabla 4). En Morelos, desde el 2017 al 2019 los serotipos 1 y 2 fueron los que circularon en el estado. Los municipios de Yauatepec y Cuautla son los que reportar más casos por dengue en el 2018.

Tabla 3 Datos sobre el número de casos de Dengue por entidad federativa en México, durante el 2018 y 2019. Tomado de SSA 2019

ESTADO	PROBABLES		CONFIRMADOS 2018 - 2019				TOTAL CONFIRMADOS		DEFUNCIONES	
	2018	2019	DNG 2018	DNG 2019	DCSA + DG 2018	DCSA + DG 2019	2018	2019	2018	2019
JALISCO	14,917	81,188	2,210	7,713	441	4,014	2,651	11,727	6	49
VERACRUZ	15,895	51,197	2,239	9,195	467	1,707	2,706	10,902	12	37
CHIAPAS	10,545	17,711	760	595	2,599	1,646	3,359	2,241	40	22
QUINTANA ROO	1,609	10,860	163	913	41	1,037	204	1,950	0	13
OAXACA	5,111	16,963	179	1,054	125	624	304	1,678	7	6
PUEBLA	785	7,115	129	1,365	1	288	130	1,653	0	5
SAN LUIS POTOSÍ	2,253	9,744	630	1,507	30	104	660	1,611	0	0
MORELOS	1,575	10,828	19	393	70	1,027	98	1,420	0	26
MICHOACÁN	2,099	5,443	312	1,122	9	115	321	1,237	2	1
TABASCO	1,146	7,587	56	262	36	677	92	939	1	10
HIDALGO	439	2,524	134	846	5	66	139	912	0	1
GUERRERO	1,972	10,509	66	315	54	591	120	906	2	18
NUEVO LEÓN	6,120	4,071	535	411	452	317	987	728	0	0
NAYARIT	1,232	6,620	70	258	29	454	99	712	1	1
YUCATÁN	1,125	4,753	13	261	6	392	19	653	0	1

Tabla 4. Incidencia de los casos de Dengue no grave, dengue con síntomas de alarma y dengue grave en el estado de Morelos durante 2019 Tomada de Panorama Epidemiológico de Dengue 2019.

Casos confirmados de Dengue; Morelos, 2019-2020.

INDICADOR	2019 CIERRE	2019 SEMANA	2020 SEMANA
DNG**	395	393	400
DCSA	983	953	213
DG	75	74	13
DCSA + DG	1,058	1,027	226
TOTAL CONFIRMADOS	1,453	1,420	626
DEFUNCIONES	27	26	2
LETALIDAD&	2.55	2.53	0.88

APor 100 casos de DCSA + DG.

MUNICIPIO	DNG		DCSA + DG		SEROTIPO
	CASOS	TASA*	CASOS	TASA*	
TLAQUILTENANGO	49	139.83	20	57.07	1 2
TLALTIZAPAN	73	132.27	29	52.55	1 2
XOCHITLA	28	45.42	32	51.90	1 2
MAZATEPEC	9	85.30	0	0.00	2
RESTO	241	12.90	145	7.76	1 2
TOTAL	400	19.70	226	11.13	

*Incidencia por 100 000 habitantes

Por los datos mostrados en la anterior tabla podemos confirmar que el Dengue es una enfermedad de importancia para el estado de Morelos, y que entre el 2019 y 2020, se tuvo un repunte en casos de Dengue en este estado.

1.2. AGENTE ETIOLÓGICO.

1.2.1. GENERALIDADES Y ESTRUCTURA DEL VIRUS DENGUE.

El DENV es un virus icosaedro de 50 nm, aproximadamente, conformado por una membrana lipídica (obtenida de las células del huésped), sobre la cual se insertan las proteínas de membrana y de envoltura. El interior del virus contiene el complejo riboproteico formado por la proteína de la cápside y el genoma viral, que consiste en una única hebra de ARN de sentido positivo de aproximadamente 11 kilobases, y que codifica tanto las proteínas estructurales, que formarán parte de la partícula viral, como las proteínas no estructurales, que intervienen durante los procesos de ensamblaje y replicación del ARN genómico (Lindenbach B, 2007).

El virión maduro tiene tres proteínas estructurales: la proteína C de la nucleocápside, la proteína pre- M y M, asociada a la membrana y la proteína E, de la envoltura, así como 7 proteínas no estructurales: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5 (Figuras 5 y 6).

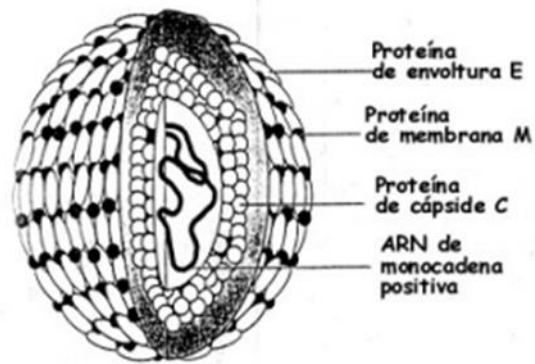


Figura 5. Esquema que describe la estructura del Virus Dengue, mostrando la localización y organización de las proteínas estructurales, así como el ARN viral. Tomado de Acosta, C 2005.

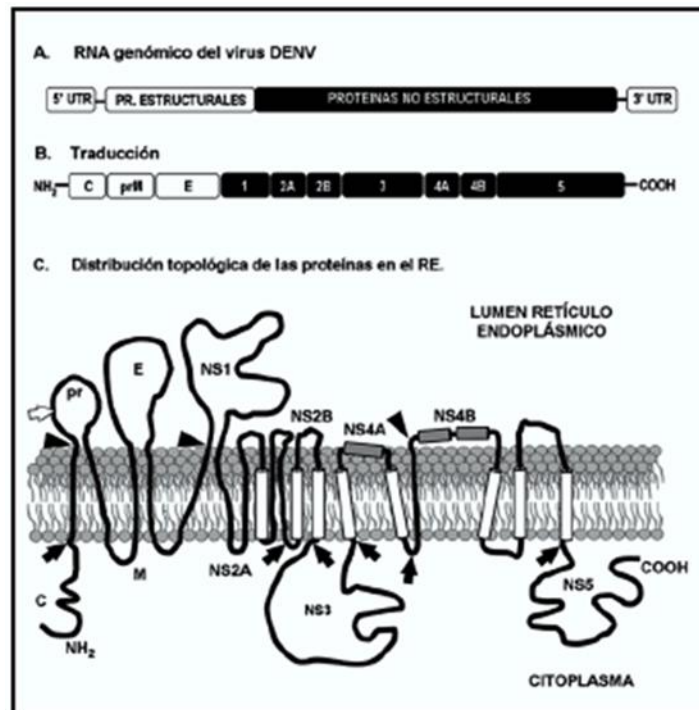


Figura 6. Esquema que representa la organización del genoma del virus del dengue, así como la localización de las proteínas en la membrana del RE, durante la transcripción. Tomada de Velandia 2011.

Las proteínas estructurales tienen la función de formar la partícula viral y proteger el genoma. La proteína de la cápside (C) actúa como un emisor de señales a través de la membrana, que permite su interacción con el ARN viral y favorece la formación de la nucleocápside (Laredo T, 2012). La proteína pre-M participa en la maduración de la partícula viral y según lo descrito por Catteau et al, también podría estar involucrada en la inducción de apoptosis de diferentes líneas celulares durante la infección. Además, esta proteína sirve de chaperona de la proteína E, ya que durante el trayecto de salida del virión ésta es procesada en la región de la red Trans-Golgi (TGN) por una proteasa celular similar a la furina, por lo que los viriones maduros carecen del extremo amino terminal, denominándose proteína M (Malavige G, 2013). La proteína que se encuentra más expuesta en el virión es la proteína de envoltura (E). Diferentes estudios han mostrado que puede ser importante en el reconocimiento de la célula blanco y que participa en la infección celular, facilitando la internalización del virus a la célula. Esta proteína está formada de tres dominios estructurales, dos de ellos no lineales y un tercero constituido por una estructura parecida al dominio de inmunoglobulina. Justo en el dominio III se encuentran los determinantes antigénicos de serotipo y en los dominios I y II epítopes de reacción cruzada (Mukhopadhyay S, 2005).

Las proteínas no estructurales tienen múltiples funciones principalmente relacionadas con la replicación viral, como son el establecimiento de un complejo de replicación formado por las proteínas NS, proteínas y cofactores del hospedero y vesículas lipídicas de las membranas del retículo endoplásmico. En estos sitios las proteínas NS1, NS2b, NS3, NS4 y NS5 permiten la traducción del RNA, generando una poliproteína y su proteólisis, lo que va a favorecer la generación de las proteínas para la replicación del RNA viral y el ensamblaje de las nuevas partículas. Por otra parte, se sabe que la proteína NS1, está asociada con el control de la respuesta inmune anti-viral del hospedero (Zeidler J, 2017), y que producen una respuesta humoral.

1.2.2. SEROTIPOS Y GENOTIPOS DEL DENV.

Existen 4 serotipos distintos del DENV, pero estrechamente emparentados, llamados: DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4, los cuales se definen por el reconocimiento de sueros específicos para cada uno (Velandia M, 2011). Además de los serotipos, también existen variaciones génicas dentro de cada uno, llamados genotipos. Es así que para el DENV-1 y DENV-2 se han descrito 5 genotipos para cada uno, y 4 genotipos para cada uno de los serotipos DENV-3 y DENV-4 (Laredo T, 2012). Se reconoce que algunos de estos genotipos presentan mayor virulencia que los otros.

A su vez, también se han descrito dos grandes grupos de virus dependiendo del origen, ya que los genotipos americanos tienen diferencias características con las cepas de origen surasiático, donde estos últimos se han caracterizado por su capacidad de desarrollar formas más graves de la enfermedad, así como su habilidad de replicarse en macrófagos y en la secuencia y estructura secundaria del ARN de la región 3' UTR del virus, esta diferencia se ha propuesto que puede ser debida a cambios en el aminoácido Glu-390 (un determinante de virulencia) (Pizarro D, 2009). Así mismo se reconoce que las cepas americanas tienden a presentar deficiencias para replicarse en el mosquito *A. aegypti* en comparación con los virus de origen asiático, por lo que podrían ser menos transmisibles (Corrales E, 2012).

Se han llevado a cabo diversos estudios del genoma del DENV y se ha mostrado que estos pueden modificarse durante una epidemia, en comparación al genotipo de origen. Sin embargo, es necesario realizar más estudios para confirmar que estas modificaciones se dirigen a la generación de las formas más virulentas (Rodríguez R, 2005 y Chen H, 2008).

1.3. MANIFESTACIONES DEL DENGUE.

El dengue provoca un amplio espectro patológico, que puede ir desde una enfermedad asintomática (la persona infectada no presenta signos o síntomas de enfermedad) hasta presentar síntomas graves. Si bien esta forma de enfermedad es menos frecuente, algunas personas pueden evolucionar hacia un dengue grave, que puede desencadenar un número indeterminado de complicaciones vinculadas a hemorragias graves, insuficiencia orgánica o extravasación de plasma (WHO, 2020). Los primeros síntomas de la infección por Dengue ocurren abruptamente después de un periodo de incubación, posterior a la picadura del mosquito, que puede ser de 3 a 14 días (en promedio 7 días). Esta infección se caracteriza por cursar tres fases: la fase febril, fase crítica y fase de recuperación (WHO Guía bolsillo 2013).

Fase febril: Los pacientes desarrollan fiebre alta y repentina, habitualmente puede durar de 2 a 7 días, y suele acompañarse de enrojecimiento facial, eritema, dolor corporal generalizado, mialgia, artralgia, cefalea y dolor retro orbitario (OPS 2015). Los trastornos gastrointestinales (anorexia, náuseas, vómito y evacuaciones líquidas) son comunes, y resulta importante resaltar que el descenso de la fiebre puede asociarse con el momento en el que el paciente puede pasar a la siguiente etapa (WHO Guía bolsillo, 2013).

Fase crítica: Inicia cuando la temperatura desciende a 37.5°C, por lo general, y se caracteriza porque puede haber un aumento de la permeabilidad capilar; al tiempo que se incrementan los niveles de hematocrito (Srikiatkachorn A, 2007). Esto marca el comienzo de la fase crítica, donde ocurren las manifestaciones clínicas debidas a la extravasación de plasma, que por lo general dura de 24 a 48 horas y puede asociarse con hemorragia de la mucosa nasal (epistaxis) de las encías (gingivorragia), y sangrado transvaginal en mujeres en edad fértil (metrorragia o hipermenorrea) (OPS, 2015).

La leucopenia con neutropenia y linfocitosis con 15% a 20% de formas atípicas, seguida de una rápida disminución del recuento de plaquetas, suele preceder la

extravasación de plasma (Bandyopadhyay S, 2006). En este punto, los pacientes sin un gran aumento de la permeabilidad capilar mejoran, mientras que aquellos con mayor permeabilidad capilar pueden empeorar como resultado de la pérdida de volumen plasmático y llegar a presentar signos de alarma.

Fase de recuperación: Cuando el paciente supera la fase crítica, pasa a la fase de recuperación, que es cuando tiene lugar una reabsorción gradual del líquido extravasado, que retorna del compartimiento extravascular al intravascular. Esta etapa de reabsorción de líquidos puede durar de 48 a 72 horas (WHO/PAHO 2013).

En estos casos, se mejora el estado general, se recupera el apetito, disminuyen los síntomas gastrointestinales, se estabiliza el estado hemodinámico y aumenta la diuresis. Algunas veces puede presentarse una erupción tardía denominada “islas blancas en un mar rojo” acompañada de prurito generalizado (Kautner I, 1997).

El hematocrito se estabiliza o puede ser más bajo debido al efecto de dilución causado por el líquido reabsorbido. Normalmente, el número de glóbulos blancos comienza a subir con el aumento de los neutrófilos y la disminución de los linfocitos. La recuperación del número de plaquetas suele ser posterior a la de los glóbulos blancos (WHO 2017).

1.3.1 DEFINICIÓN DE LOS CASOS DE DENGUE CON Y SIN SÍNTOMAS DE ALARMA, Y DENGUE GRAVE.

El dengue es una sola enfermedad con presentaciones clínicas diferentes y, a menudo con evolución y resultados impredecibles (Rigau P, 1997). Aunque la mayoría de los pacientes se recuperan después de un curso clínico benigno y de resolución espontánea, una pequeña proporción progresa a una enfermedad grave, caracterizada principalmente por aumento de la permeabilidad vascular, con hemorragia o sin ella (WHO, 2009).

Según la clasificación de la Organización Mundial de la Salud de 2009, considera dos categorías llamadas dengue y dengue grave (Guía Dengue OPS 2016).

Además, a la categoría de Dengue se le divide también en sin signos de alarma y con signos de alarma. A continuación se describirá brevemente las características de signos y síntomas presentes para cada forma de la enfermedad por virus dengue y en la Tabla 6 podemos observar detalladamente la sintomatología de cada una.

1. **Dengue** (fiebre por dengue, antes llamado dengue clásico):
 - **Sin signos de alarma (DSSA):** La manifestación clínica del dengue sin signos de alarma coincide con lo descrito para la fase febril del dengue (anteriormente descrito). Esta enfermedad suele durar por lo general, una semana y pasar luego a una convalecencia que puede durar varias semanas e incluso meses en algunos casos (síndrome post-dengue). En general los pacientes mejoran después de la caída de la fiebre (término de la etapa febril e inicio de la etapa crítica) (WHO/PAHO 2013).
 - **Con signos de alarma (DCSA):** Se refiere a los pacientes que empeoran con el descenso de la fiebre y que presentan alteraciones a consecuencia del incremento de la permeabilidad capilar y presentan los signos de alarma: dolor abdominal intenso y continuo o dolor a la palpación del abdomen, vómito persistente, acumulación de líquidos, sangrado activo de mucosas, alteración del estado de conciencia, hepatomegalia, y aumento progresivo del hematocrito (WHO/PAHO 2013).

Estos pacientes casi siempre se recuperan con la rehidratación intravenosa temprana.

No obstante, algunos casos que no reciben tratamiento oportuno y adecuado, ya sea porque no son diagnosticados tempranamente, porque se le administran soluciones inadecuadas (en composición, volumen, velocidad) o porque no tienen seguimiento del personal de salud durante las diferentes etapas de la enfermedad, son los que comúnmente evolucionan a las formas graves de la enfermedad.

2. **Dengue grave** (fiebre hemorrágica por dengue). Un paciente con dengue grave es aquel clasificado así porque presenta signos y síntomas de una complicación que, de no tratarse adecuadamente, puede ser mortal o tiene otra afección que determina su gravedad.

Se caracteriza por uno o más de los siguientes síntomas:

- Choque o dificultad respiratoria debido a extravasación de plasma; Se considera que un paciente está en choque, si la presión del pulso (la diferencia entre presión diastólica y sistólica) es ≤ 20 mm Hg, y se presentan al menos dos de los signos de mala perfusión capilar (extremidades frías, llenado capilar lento > 2 segundos, piel moteada); esto es igual para los niños que para los adultos (WHO 2013).
- Sangrado considerado clínicamente importante; Las hemorragias graves son multicausales ya que a ellas contribuyen factores vasculares, desequilibrio entre coagulación y fibrinólisis y trombocitopenia, entre otros. En el dengue grave pueden presentarse alteraciones de la coagulación, aunque no suelen ser suficientes para causar hemorragia grave. Si el sangrado es mayor, casi siempre se asocia a choque grave, en combinación con hipoxia y acidosis metabólica, que pueden conducir a falla multiorgánica y coagulopatía de consumo.
- Afección grave de órganos: Los pacientes también pueden sufrir de insuficiencia hepática aguda, miocarditis, encefalitis o insuficiencia renal; incluso en ausencia de extravasación grave del plasma o choque. Ese grave compromiso de órganos es por sí solo criterio de dengue grave.

El cuadro clínico es similar al que se observa cuando esos órganos son afectados por otras causas. Tal es el caso de la hepatitis fulminante por dengue, en la que el paciente puede presentar ictericia, signo por demás poco frecuente en el dengue, en el que se altera la función del hígado y que se expresa un aumento de las aminotransferasas a 10 o más veces su valor normal máximo, asociado a elevación del tiempo de protrombina (TP).

La miocarditis por dengue se expresa principalmente con alteraciones del ritmo cardiaco (taquiarritmias y bradiarritmias), inversión de la onda T y del segmento ST con disfunción ventricular (disminución de la fracción de eyección del ventrículo izquierdo); las enzimas cardiacas se pueden encontrar elevadas. El compromiso grave del sistema nervioso central se manifiesta principalmente con convulsiones y trastornos de la conciencia (Kularatne S, 2008). En las encefalitis por dengue, el estudio del líquido cefalorraquídeo puede mostrar la presencia del virus o su antígeno NS1 o la presencia de anticuerpos IgM específicos (Araujo F, 2008).

Tabla 5. Clasificación modificada de la definición sintomática del dengue, OPS/OMS.

Dengue sin signos de alarma - DSSA	Dengue con signos de alarma - DCSA	Dengue grave - DG
<p>Persona que vive o ha viajado en los últimos 14 días a zonas con transmisión de dengue y presenta fiebre habitualmente de 2 a 7 días de evolución y 2 o más de las siguientes manifestaciones:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Náuseas / vómitos 2. Exantema 3. Cefalea / dolor retroorbitario 4. Mialgia / artralgia 5. Petequias o prueba del torniquete (+) 6. Leucopenia <p>También puede considerarse caso todo niño proveniente o residente en zona con transmisión de dengue, con cuadro febril agudo, usualmente entre 2 a 7 días y sin foco aparente.</p>	<p>Todo caso de dengue que cerca de y preferentemente a la caída de la fiebre presenta uno o más de los siguientes signos:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Dolor abdominal intenso o dolor a la palpación del abdomen 2. Vómitos persistentes 3. Acumulación de líquidos (ascitis, derrame pleural, derrame pericárdico) 4. Sangrado de mucosas 5. Letargo / irritabilidad 6. Hipotensión postural (lipotimia) 7. Hepatomegalia >2 cm 8. Aumento progresivo del hematocrito 	<p>Todo caso de dengue que tiene una o más de las siguientes manifestaciones:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Choque o dificultad respiratoria debido a extravasación grave de plasma. Choque evidenciado por: pulso débil o indetectable, taquicardia, extremidades frías y llenado capilar >2 segundos, presión de pulso ≤20 mmHg: hipotensión en fase tardía. 2. Sangrado grave: según la evaluación del médico tratante (ejemplo: hematemesis, melena, metrorragia voluminosa, sangrado del sistema nervioso central (SNC)) 3. Compromiso grave de órganos, como daño hepático (AST o ALT ≥ 1000 UI), SNC (alteración de conciencia), corazón (miocarditis) u otros órganos
<p>Requieren observación estricta e intervención médica inmediata</p>		

Fuente Guía Dengue OPS/OMS 2017.

1.4 TEORÍAS SOBRE LAS CAUSAS DE LA PATOLOGÍA.

1.4.1. FACTORES VIRALES.

Existen diversas hipótesis para explicar la virulencia y el desarrollo de las formas graves de la enfermedad. Entre ellas se sugieren que factores, como la edad, las variaciones en el genoma viral y diferencias entre los serotipos del DENV, podrían favorecer el desarrollo del dengue grave (DG).

En los años 70 Rosen y Gubler llevaron a cabo estudios epidemiológicos y entomológicos en el pacífico sur de Asia donde describieron por primera vez que había diferencias en la virulencia del dengue (Gubler D, y Rosen L, 1978).

En 1981 se describió en la región de las Américas, específicamente en Cuba, la primera epidemia de fiebre hemorrágica por dengue (FHD) que coincidió con la introducción de un genotipo de DENV-2, potencialmente más virulento, y cuyo origen es surasiático. En esta epidemia se observó un incremento en la incidencia de casos con manifestaciones severas de la enfermedad y de casos fatales. También se propuso que en esta epidemia el virus circulante evolucionó hacia variantes más virulentas y, se sugiere, que por esta razón la tasa de mortalidad fue en aumento al final de la epidemia. Casos similares fueron descritos en 1992 durante la epidemia de dengue en Australia y en 1997 nuevamente en Cuba (Martina B, 2009).

Lo que sí es un hecho es que los genotipos americanos tienen diferencias características con las cepas de origen surasiático, los cuales se han caracterizado por su capacidad de desarrollar las formas más graves de la enfermedad. Se ha observado que entre estas cepas existe una diferencia en el aminoácido E-390 (un determinante de virulencia), y que varían en la habilidad de replicarse en macrófagos y en la secuencia y estructura secundaria del ARN de la región 3' UTR. También se sabe que las cepas americanas tienden a presentar deficiencias para replicarse en *A. aegypti*, en comparación con los virus de origen asiático, por lo que podrían ser menos transmisibles (Corrales E, 2012).

Así mismo se ha propuesto como un factor importante para el desarrollo de las formas graves de la enfermedad, es la secuencia u orden de infección con los diferentes serotipos y el tiempo entre la primera y segunda infección. Se ha descrito que en epidemias con alta incidencia de FHD, se relacionan con una primera infección por DENV-1, seguida de una infección con DENV-2 o DENV-3 (Martina B, 2009).

1.4.2 FACTORES ASOCIADOS AL HOSPEDERO.

Aunque el blanco principal del virus Dengue son los macrófagos, que están presentes en diferentes órganos tales como, los ganglios linfáticos, el encéfalo, el miocardio, el hígado, el intestino, el bazo, el riñón, y que también puede infectar otros tipos celulares como los linfocitos T, las células dendríticas, las células epiteliales, los fibroblastos, las neuronas y las plaquetas (Soe H.et al. 2017), en esta última inclusive se ha observado que pueden llegar a completar su ciclo viral (Sutherland S, 2015).

Por otra parte los mecanismos de la inmunopatogenesis del dengue aún no se tienen muy claros, sobretodo, por un lado, debido a la falta de un modelo animal apropiado para estudiar la fisiopatología de la enfermedad y, por el otro lado, debido a la gran variación de datos obtenidos de pacientes dificultan esclarecer los fenómenos de la patología de la infección. A pesar de esto ya existen diversas hipótesis que tratan de explicar la patología de la infección por DENV, tales como:

1.4.3. Respuesta potenciada mediada por anticuerpos (ADE, antibody dependent enhancement).

Descrita en diferentes artículos (Velandia M, 2011, Beita J, 2016, Lee 2016), esta hipótesis hace referencia a que en una infección subsecuente en personas pre-inmunizadas con un serotipo heterólogo podría causar una respuesta intensificada por medio de los anticuerpos preexistentes, es decir exacerbar, en lugar de mitigar la enfermedad, según lo descrito por Beita Jiménez. Dicho de manera más

específica, se basa en que durante una infección primaria se generan anticuerpos neutralizantes contra el serotipo infectante y cuando estos se unen a un virus heterotípico durante una infección subsiguiente facilitan la entrada del virus a través de la endocitosis mediada por el receptor Fcγ, al unirse a monocitos y macrófagos (de Alwis R, 2014), además, se ha encontrado que las infecciones por DENV producidas a través de ADE (en comparación con la ruta de entrada convencional) producen una viremia más alta y un estado antiviral del huésped suprimido (Ubol S, 2010), y como consecuencia, un aumento en la producción de mediadores que incrementan la permeabilidad vascular (Al-Sadi et al. 2008).

1.4.4. TORMENTA DE CITOCINAS.

Una hipótesis con buena aceptación sobre la patogenia del dengue grave es la aparición de una "tormenta de citocinas", es decir, alteraciones de los niveles de citocinas que pueden inducir el mal funcionamiento de las células endoteliales (Chaturvedi U, 2000). En esta teoría se propone la alteración de la secreción de citocinas pro-inflamatorias (IL-6, IL-1β y TNF), de quimiocinas y citocinas anti-inflamatorias como IL-4 e IL-10, en pacientes con infección con virus dengue durante la etapa febril, siendo en las manifestaciones graves donde se han encontrado estas citocinas en mayor concentración (Campos de Melo et al, 2016 Restrepo B. 2010, Corrales E, 2012).

Una posible respuesta a esta manifestación es la reacción cruzada con células T de memoria CD8+, en donde dichas células reaccionarían de manera diferente a los epítopos heterólogos que a los epítopos homólogos, produciendo niveles altos de citocinas pro-inflamatorias. La depuración retardada del virus prolongaría la activación de dichas células (Martina B, 2009), o la posibilidad de que al momento de una infección por un virus DENV heterólogo se active una pequeña subpoblación de células T que poseen reactividad cruzada (Miranda C, 2013). En ambos casos el resultado sería la producción de altos niveles de citocinas como TNF e IL-6, y esto a su vez lleva a la permeabilidad vascular y la pérdida de plasma.

Así mismo, se ha descrito que la proteína NS1 interactúa con el sistema de complemento para activar células del sistema inmune innato como monocitos, produciendo un aumento dependiente de la dosis en la secreción de citocinas como IL-6, IL-1 β , y TNF, y esto sea un contribuyente a la tormenta de citocinas (Malavige G, 2017). Además también ha sido descrito que puede haber sinergismo entre citocinas, por ejemplo TNF, y la IL-1 β , que juntas pueden aumentar la permeabilidad capilar en comparación a cuando actúan de manera independiente (Rathakrishnan A, 2012).

1.5. MACRÓFAGOS Y SU PAPEL EN LA INFLAMACIÓN.

Los macrófagos pertenecen al sistema de fagocitos mononucleares (MPS), una familia de fagocitos profesionales que incluye monocitos y células dendríticas (CD) (Parisi L, 2018). Los macrófagos son capaces de secretar más de 100 productos biológicamente activos y poseen más de 100 receptores de superficie celular.

Estas células derivan de progenitores hematopoyéticos de la médula ósea que se diferencian bajo la influencia de factores de crecimiento específicos dentro de los tejidos. Después de circular por la sangre como monocitos, se infiltran en los tejidos donde se adaptan al microambiente local como macrófagos, para desempeñar funciones específicas (Ginhoux F, 2010). La abundancia de macrófagos dentro de los tejidos se controla finamente a través del eje factor estimulante de colonias 1 o factor estimulante de colonias de macrófagos (CSF-1 o M-CSF), IL-34 y receptor del factor estimulante de colonias (CSFR) (Parisi L, 2018). Son un componente importante del sistema inmunitario innato y funcionan como una de las primeras líneas de defensa contra los patógenos invasores (Mosser D, y Edwards J, 2008). Además, son críticos en el mantenimiento de la homeostasis tisular y el recambio de los sistemas de tejidos y órganos. Tras su descubrimiento por Metchnikoff a finales del siglo XIX, y hasta hace poco, los macrófagos estaban asociados principalmente con funciones pro-inflamatorias y bactericidas. Sin embargo, ahora se sabe que existen diferentes subpoblaciones de macrófagos, que cumplen una gran variedad de funciones, según lo dicte el ambiente donde se encuentren, estas pueden ser: la fagocitosis, amplificación de eventos pro-inflamatorios o, por el contrario, participar en la supresión de la inflamación, promover la recuperación del tejido después de la lesión, devolver los tejidos a sus puntos de ajuste homeostáticos, regulación de la respuesta inmune por la presentación de antígenos a células T (Fernando R, 2014 y 2016, Ochoa F, 2013). Es por ello que en la actualidad se considera que intervienen en diversas funciones preponderantes del hospedero. Para ello, llevan a cabo seis funciones esenciales:

- 1) Fagocitosis de microorganismos y algunas células.
- 2) Eliminación de células viejas, cuerpos apoptóticos, detritus y cuerpos extraños.
- 3) Regulación de hematopoyesis.
- 4) Interacción bidireccional con linfocitos y presentación de antígenos para montar respuesta inmune específica.
- 5) Secreción de más de 100 productos biológicamente activos.
- 6) Actividad antitumoral.

Para poder realizar tan amplia gama de actividades, son células muy plásticas que se adaptan a las señales del ambiente, y ello ha llevado a que se clasifiquen en diferentes subpoblaciones, principalmente en dos grupos; los macrófagos tipo 1 (M1) y macrófagos tipo 2 (M2), esto dependerá del entorno y la forma en que se dé la señalización para su activación. Los macrófagos activados clásicamente (CAM o macrófagos M1), que son el subconjunto de macrófagos pro-inflamatorios prototípicos inducidos por la exposición a interferón- γ (IFN γ) y / o lipopolisacárido (LPS), secretan TNF, IL-1 β , IL-12, promueven la generación de linfocitos Th1, liberan especies reactivas de oxígeno y moléculas derivadas de óxido nítrico, por lo que son microbicidas y pueden destruir células tumorales. Mientras que el tratamiento con IL-4 o IL-13 induce la activación de macrófagos activados alternativamente (AAMs) o M2, que expresan niveles elevados del receptor de manosa (MRC1 / CD206). Sin embargo, dentro de esta misma población se han encontrado grandes diferencias, y se ha generado una subclasificación (Fernando M, 2014 y Ochoa F, 2013). Por ejemplo, los AAM diferenciados por IL-4 y / o IL-13, también se les ha llamado M2a, si son inducidos por complejos inmunes, y son secretores de IL-4. Por otro lado, hay una subpoblación que produce altas concentraciones de IL-10, los llamados M2b. A su vez, las células 'desactivadas' por exposición a IL-10 se refieren como macrófagos M2c (Mantovani A, 2004).

Los macrófagos M1 están preparados para responder rápidamente a patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), a través de su reconocimiento por receptores específicos para estos (PPR, receptores de patrones de patogenicidad) con la secreción de factor de necrosis tumoral (TNF), que a su vez promueve la liberación de muchos otros mediadores inflamatorios, incluida la interleucina IL-6, así como IL-12/23 (p40) y los interferones de tipo I (Hamidzadeh K, 2017).

La polarización y las funciones de los macrófagos se regulan estrictamente mediante la activación de varias vías interconectadas. Las vías de señalización dependientes de quinasas que emanan de los PPR en macrófagos están bien descritas. Estas vías activan los factores de transcripción latentes, que incluyen NF- κ B, CREB, AP-1 y los factores reguladores del interferón (IRF). Se ha demostrado que la activación de STAT1 promueve la polarización de macrófagos M1, resultando en funciones citotóxicas y pro-inflamatorias (Parisi L, 2018). Estas respuestas inflamatorias se ven activadas por la presencia de interferón- γ (IFN- γ), que aumenta dramáticamente la producción de mediadores inflamatorios por los macrófagos. La unión de los interferones a sus receptores afines desencadena la fosforilación de la tirosina de STAT1, su localización en el núcleo y la unión al ADN, lo que lleva a la transcripción de al menos 200 genes tales como: GM-CSF, IL-12, p40, TNF e IL-6 (Boehm U, 1997).

La unión de STAT1 con IFN- γ , aumenta las respuestas inflamatorias de los macrófagos por muchos mecanismos diversos. STAT1 induce modificaciones covalentes a las histonas para asumir una conformación activa, permitiendo el ensamblaje de complejos de transcripción en genes de citocinas inflamatorias (Qiao Y, 2013).

Finalmente, se sabe que la señalización vía STAT1 mediada por IFN- γ potencia la señalización inflamatoria debido a la inhibición de la secreción de IL-10, y esto se debe a que el IFN- γ suprime a SOCS3 y TLR2 que son esenciales para la secreción de esta. (Hamidzadeh K, 2017).

Es debido a esta amplia capacidad de generar respuestas tan diferentes entre sí, además de ser una célula blanco de DENV, que resultan muy interesantes para su estudio y entender los mecanismos de patogenia de este virus.

2. ANTECEDENTES.

Se ha propuesto que la aparición de las formas graves de la enfermedad causada por el virus dengue, es el resultado de una interacción compleja entre el virus y los factores inmunes del huésped (Flores L, 2017). Estudios en el pasado reciente han resaltado el papel de las citocinas en la patogénesis del dengue grave y han estudiado la utilidad de estos biomarcadores como factores de riesgo (Bethell D, 1998). Se ha demostrado claramente que la respuesta inflamatoria asociada con la producción de citocinas desregulada desempeña funciones críticas en el desarrollo del dengue grave (Pang T, 2007, Pnag X, 2017). Algunos de estos estudios han encontrado varias citocinas elevadas en pacientes con dengue grave en comparación con el dengue sin complicaciones, como son TNF, IL-1 β , IFN- γ , IL-4, IL-6, IL-13, IL-7 y GM-CSF (Sehrawat P, 2018).

Estudios clínicos apoyan un papel clave de las citocinas en la extravasación de plasma (Fink J, 2006). Durante las infecciones por el virus del dengue, las citocinas están involucradas en el inicio de la enfermedad y la regulación homeostática. Específicamente, TNF, IL-1 β e IL-6 se han asociado con los marcadores de activación de la coagulación (Suharti C, 2002).

Kurane y Ennis plantearon la hipótesis de que el rápido aumento de los niveles y los efectos sinérgicos de los mediadores (como TNF, IL-2, IL-6) causa aumento de la permeabilidad vascular, pérdida de plasma y shock (Nimmannitya S, 1999).

La citocina IL-6 es secretada por células T, macrófagos, células NK y células endoteliales activadas para estimular la respuesta inmune innata. La IL-6 es un potente mediador de la fiebre y las reacciones de fase aguda (Mangione J, 2014).

La sobreproducción de IL-6 podría jugar un papel crucial en la fuga capilar. M. Juffrie et al. Encontraron que para los pacientes con niveles elevados de IL-6, la incidencia de ascitis se incrementó (Juffrie M, 2001). La IL-6 podría ejercer sus efectos pro inflamatorios por medio de la inducción del mediador Fosfolipasa A2 soluble (sPLA2), ya que en pacientes se ha encontrado un aumento en los niveles de esta

proteína, asociada a derrame pleural y ascitis, ambos señal de fuga de plasma (Rachman A, 2006).

La alta concentración de IL-6 podría jugar un papel importante en la producción incrementada de auto anticuerpos anti plaquetarios, y la deficiencia del factor XII de coagulación en la vía intrínseca (Campos de Melo et al., 2016 Y Rachman A, 2006).

Rolph et al. Realizaron un estudio en macrófagos primarios de humanos, y encontraron que IL-6, inducía la expresión de SOCS3 y la inhibición de la vía JAK-STAT (Rolph Ms, 2011). De los ocho miembros de la familia, SOCS1 y SOCS3 son los inhibidores más potentes de la señalización de citocinas mediada por la vía JAK / STAT. La sobreexpresión de SOCS3 se asocia con la desregulación de la respuesta inmune y los patrones de secreción de citocinas (Dimitriou, I et al 2008).

Xing Z, et al., Encontraron que la IL-6 regula a la baja la expresión de citocinas pro-inflamatorias al mismo tiempo que induce la expresión del antagonista del receptor de IL-1 y el receptor de TNF (Xing Z, 1998).

Así mismo se sabe que las plaquetas forman agregados de plaquetas y monocitos que se correlacionan con la presencia de trombocitopenia, y estos complejos se asocian significativamente con la fuga vascular. Dichas interacciones plaquetas-monocitos inducen la producción de citocinas por los monocitos como IL-1 β (Hottz E, 2014). Además las micropartículas derivadas de plaquetas son una fuente importante de IL-1 β durante la infección por dengue, que se cree que se genera por la activación del inflammasoma NLRP3, y así contribuyen a las manifestaciones de dengue grave (Hottz E, 2013).

Por otra parte, el TNF tiene efectos pro-inflamatorios, potenciadores de la permeabilidad vascular y activadores de la coagulación. Se han encontrado niveles más elevados de TNF en dengue grave en comparación con fiebre por dengue (Butthep B, 2012). Sin embargo, su papel en la patogénesis en Dengue grave sigue sin estar claro. Se ha propuesto que el TNF es secretado por monocitos infectados por el virus del dengue, lo que induce que las células endoteliales produzcan

especies reactivas de oxígeno, lo que lleva a la muerte de células apoptóticas y por lo tanto a la hemorragia (Yen Y, 2008).

Por medio de varios estudios realizados *in vitro*, donde se utiliza a monocitos como modelos para describir la producción de citocinas en respuesta a la infección por DENV, se sabe que los macrófagos juegan un papel importante en la producción de estas citocinas. Por ejemplo en el estudio realizado por Espina et al, donde infectó monocitos con DENV-2, observó una alta producción de TNF, en comparación con monocitos sin estimular, además observó que la producción de dicha citocina dependía de la replicación viral, ya que los niveles de producción de TNF disminuyeron cuando la infección se realizó con virus inactivado (Espina L, et al, 2003).

Así mismo en diversos estudios *in vitro* donde se han infectado macrófagos con DENV-2 se ha visto que estos producen altos nivel de citocinas, IL-1 β , IL-8, IL-6, TNF y MIP-1 β en respuesta a la infección, en comparación con macrófagos no infectados (Chen Y, 2002). Incluso en nuestro laboratorios se ha observado una cinética en la que primero se produce TNF, posteriormente IL-1 β e IL-6, y finalmente TGF β (Flores K, 2006)

Finalmente se sabe que la proteína NS1 del DENV puede inducir la activación de macrófagos, a través del receptor TLR4, lo cual induce la producción de TNF, IL-6 e IL-1 β , con lo cual se explicaría el papel de los macrófagos en patogenia de la infección con DENV (Modhiran N, et al, 2015).

3. JUSTIFICACIÓN.

El Dengue es la infección transmitida por vector que mayor número de casos genera en México y en el mundo. No solo representa un problema por el número de pacientes, pues su letalidad es baja, sino que también genera una gran carga económica, debido a la necesidad de hacer campañas de prevención, tratamiento y seguimiento de las personas infectadas.

Como ya se describió, el dengue es una sola enfermedad con presentaciones clínicas diferentes, que en algunos casos requiere hospitalización o puede llegar a la muerte. Sin embargo, hasta el momento se desconoce qué factores se pueden asociar a la protección o a la susceptibilidad de la enfermedad.

Como los macrófagos, principales células blanco del DENV, pueden generar una respuesta pro-inflamatoria así como también anti-inflamatoria y que la infección grave por dengue se caracteriza por la elevada producción de mediadores pro-inflamatorios como TNF, IL-6 e IL-1 β , se requiere identificar si todas las citocinas se expresan y secretan al mismo tiempo, o bien una regula la producción de las otras, lo cual permitirá plantear el uso de fármacos anti-citocinas en esta enfermedad.

4. HIPÓTESIS.

La infección de macrófagos por virus Dengue serotipo 2 inducirá la expresión y secreción de citocinas pro-inflamatorias a partir de 24 horas y disminuirá a partir de las 72 horas.

5. OBJETIVOS.

5.1. OBJETIVO GENERAL.

- Establecer si la infección de macrófagos con virus Dengue serotipo 2 induce la expresión y secreción de IL-1 β , IL-6 y TNF desde las 24 horas y hasta las 96 horas post-infección.

5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Determinar la cinética de expresión de IL-1 β , IL-6 y TNF en macrófagos infectados.
 - Determinar la cinética de secreción de IL-6, TNF e IL-1 β en macrófagos infectados.

6. MATERIALES Y MÉTODOS.

6.1. CULTIVO CELULAR.

La línea celular THP-1 (ATCC TIB 202), se cultivó en medio RPMI Advance suplementado con 3% de suero fetal bovino, a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂.

6.2. DIFERENCIACIÓN DE LÍNEA CELULAR CON PMA.

La línea celular THP-1 se diferenció a un modelo de macrófago utilizando PMA (phorbol 12 myristate 13 acetate). Las células THP-1 se trataron con 10 nM de PMA (Sigma-Aldrich) durante 72 horas. Pasando este tiempo las células se observaron al microscopio para confirmar aumento de tamaño y granularidad, así su adherencia al plato de cultivo, lo que indica su diferenciación.

6.3. DENV-2 CEPA NUEVA GUINEA.

Para la infección de macrófagos se utilizó virus dengue serotipo 2 de la cepa Nueva Guinea, donados por el Dr. Humberto Lanz Mendoza del CISE-INSP. El stock original se almacenó en alícuotas en tubos Eppendorf, a - 80°C y de estos se hicieron alícuotas de trabajo, en PBS, con un título viral de 10⁷ las cuales se mantuvieron a menos 20°C.

6.4. INFECCIÓN DE CÉLULAS THP-1 CON DENV-2.

Se colocaron 1x10⁵ células THP-1, por pozo, en placas de 24 pozos, y/o 1x10⁶ células por pozo en caja de 6 pozos. Se trataron con PMA durante 72 horas y posteriormente se lavaron con PBS. Se agregó DENV2 diluido en Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, con Ca²⁺ y Mg²⁺ (DPBS, SIGMA) en un volumen final de 0.2 mL o de 0.5 mL, para tener una MOI=1. Se dejó 2 horas a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂, posterior a esto las células se lavaron con PBS, y se agregó medio fresco para realizar una cinética post-infección de 24, 48, 72 y 96 horas. Se recuperó el sobrenadante el cual fue almacenado a -20°C para su posterior análisis de citocinas por ELISA. En el caso de análisis de infección, el

procedimiento fue igual, excepto que inicialmente se colocaron cubreobjetos en los pozos, antes de colocar las células. En el caso de estudios de PCR, las células se lisaron directamente de la caja con TRI Reagent de SIGMA (CAT T9424).

6.5. TRATAMIENTO CON LPS COMO CONTROL POSITIVO DE ESTIMULACIÓN.

Las células se diferenciaron como en el caso de infección. Se lavaron con PBS y se agregó 10ng/ml de LPS en medio completo (E. coli O114:B4, cat 114M4009V Sigma). Se incubó por 24 horas y se recuperó el sobrenadante para determinar el nivel de secreción de citocinas con un tratamiento de inducción de inflamación o se lisaron las células para obtener el ARN.

6.6. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE CITOCINAS.

Se determinó la cantidad de las citocinas IL-1 β , IL-6 y TNF secretadas, por medio de ELISA, para ello se utilizaron los sobrenadantes obtenidos de la cinética de infección realizada a 24, 48, 72 y 96 horas post-infección. Para IL-6 se utilizó un ELISA desarrollado en el laboratorio, y estuches comerciales para IL-1 β (Biolegend) y TNF (Peprotech).

- a) **IL-6.** Se preparó una curva de cuantificación de IL-6 con concentraciones de 1, 2, 4, 8, 12, 16 y 20 ng/ml en PBS pH 7.2. Los sobrenadantes se diluyeron 1:1000 en PBS. Se colocaron 0.3 mL de los sobrenadantes o de la curva en una caja de 96 pozos, se incubaron toda la noche a temperatura ambiente, al siguiente día se realizaron dos lavados con PBS-Tween 0.05% (PBST), se bloqueó 1 hora con BSA 0.1% en PBST, se hicieron 2 lavados con PBST, se agregó el anticuerpo primario α -IL-6 (Santa Cruz, H-183) diluido 1:1000 en 0.1% BSA PBST, se incubó 2 horas a temperatura ambiente y agitación en columpio, se lavó 4 veces con PBST. Finalmente se agregó α -IgG conejo-HRP (JACKSON Cat, 9523) diluido 1:2000 en 0,1% BSA en PBST. Se incubó 2 horas se lavó con 0,1% de BSA en PBST. Se agregó solución de ABTS (Millipore, 92590), se incubó 45min a TA. Se leyó la densidad óptica a 405 y 650 nm, y se calculó la concentración utilizando regresión lineal.

- b) **TNF**. Para determinar el nivel de TNF se utilizó el estuche de ELISA de PEPROTECH (Human TNF Mini ELISA Development Kit, 900-M25). En una placa de 96 pozos para ELISA se colocaron 0.1 mL de anticuerpo de captura diluido en a 1mg/mL PBS. Se dejó incubar toda la noche a temperatura ambiente. Al siguiente día se realizaron 4 lavados agregando 300 μ L de solución de lavado 0.05% Tween-20 en PBS (PBST). Se bloqueó con 30 μ L de BSA1%en PBST. Posterior a los lavados se realizó la curva de cuantificación para ello se hizo la dilución en BSA 0.1% PBST (1:1) del estándar proporcionado en el kit, los sobrenadantes se diluyeron 1:1000 en el mismo buffer. Se colocaron 100 μ L de estándar o de muestra, colocando el estándar a las concentraciones de, 0.03, 0.06, 0.12, 0.25, 0.5, 1 y 2 ng/mL. Se incubó por 2 horas a TA. Pasando las 2 horas se realizaron 4 lavados descritos anteriormente. En seguida se diluyó el anticuerpo de detección a una concentración de 0.5 mg/mL y se agregó en cada pozo de la placa, se dejó incubar por 2 horas a TA. Posterior a esto se realizaron 4 lavados y se procedió a agregar Avidina HRP diluida 1:2000 para obtener una concentración final de 5.5 mg/mL, se incubo por 45 minutos a TA. Seguido a esto se realizaron 4 lavados y se agregan 100 μ L por pozo de ABTS, se dejó incubar 30 min y se realizó la lectura a 405 nm y 650 nm.
- c) **IL-1 β** . Para la determinación de IL-1 β se utilizó el estuche para IL-1 β (Human IL-1 β ELISA max deluxe set, cat 437004) de BioLegend. En una placa de 96 pozos se adicionaron 100 μ l del anticuerpo de captura y se dejó incubar toda la noche a 4°C. Al día siguiente se realizaron 4 lavados agregando 300 μ L de PBST, en seguida se adicionaron 200 μ L de diluyente A 1X, y se dejó incubar 1 hora a TA.

Durante ese tiempo se realizó la dilución de la proteína estándar para obtener la curva de cuantificación siguiendo el procedimiento dado en el kit.

Se tomaron 10 μ L de la proteína estándar que se diluyó en 90 μ L de diluyente A, se tomaron 17.9 μ L de esta solución stock y se diluyeron en 982.1 μ L de diluyente A

para obtener una concentración de 125 pg/mL y a partir de esta se realizaron diluciones seriadas 1:1.

Transcurrido el tiempo se realizaron 4 lavados de igual manera antes mencionada, se adicionaron 50 μ L de buffer de ensayo D en cada pozo, se agregaron las diluciones de la proteína estándar y las muestras diluidas 1:1, se incubo por 2 horas a TA.

Posteriormente se realizaron 4 lavados, y se adiciono 100 μ L del anticuerpo de detección se dejó incubar 1 hora a TA, pasado el tiempo se realizaron 4 lavados, y se agregó 100 μ L de Avidin-HRP , se dejó incubar 30 minutos a TA. Transcurrido el tiempo se hicieron 5 lavados, cada uno de 30 segundos, se agregó la solución F, y se dejó incubar por 20 minutos en oscuridad y pasado el tiempo se agregó 100 μ L de la solución de paro ($2\text{NH}_2\text{SO}_4$), y se leyó la absorbancia a 450 nm y 570nm.

6.7. DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE TNF, IL-6 E IL-1 β , POR RT-PCR.

Para este ensayo, se pusieron a diferenciar 1×10^6 células THP-1 en cada pozo de cajas de 6 pozos. Posteriormente estas células fueron tratadas con 10 nM de PMA como concentración final en medio RPMI Advance, suplementado con 3% de Suero Fetal Bovino por 72 horas. Posteriormente estas células se infectaron, como se describió anteriormente, con una MOI=1 del virus DENV. Otros pozos se incubaron solamente con PBS (Mock, control negativo), o se trataron con 10 ng/mL de LPS como controles positivos para el caso de las células infectadas, se evaluaron los tiempos de 24, 48 y 72 horas post infección, a estos tiempos se retiró el sobrenadante de cada pozo, se realizaron lavados con PBS, se agregó 1 mL de TRI Reagent de SIGMA (CAT T9424), y se procedió a realizar la extracción de ARN siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. De manera resumida, se agregaron 200 μ L de cloroformo se mezcló con vortex, y se dejó incubando por 15 min a TA. A continuación las muestras se centrifugaron a 12,500rpm por 15 min a 4°C, y posteriormente la fase acuosa (que contiene el ARN), se transfirió a un tubo nuevo y se añadieron 500 μ L de isopropanol, se dejó incubar por 10 min a TA, y posterior a esto se centrifugo a 12,500rpm/15 min a 4°C. En esta ocasión se desechó el sobrenadante y el pellet fue lavado con 1 mL de etanol al 75% y se

procedió a centrifugar a 7,500rpm/5min a 4°C. Finalmente se descartó el sobrenadante, el pellet se dejó secando y se re suspendió en agua libre de nucleasas. Se realizó la cuantificación de ARN por espectrometría a 280/260nm y se verificó la integridad de este mediante un gel de agarosa al 1.7%.

Posterior a este paso se realizó la síntesis de cDNA, a partir del ARN total obtenido, utilizando un kit (Thermo Scientific Revert Aid First Strand cDNA Synthesis kit), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante que se indica en la Tabla siguiente.

Reactivo	Cantidad (µL)
Primer Random Hexamer	1
5x Buffer de reacción	4
Inhibidor de RNasa Ribolock	1
10 mM dNTP mix	2
Enzima transcriptasa reversa	1

Tabla 7. Reactivos y cantidades para la síntesis de cDNA.

Además, se añadieron 4 µg de RNA, en cada tubo correspondiente y se procedió a la síntesis en un termociclador (3PRIME, de Techne) bajo las siguientes condiciones.

Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)
65	5
25	5
42	60
70	5

Tabla 8. Condiciones para la síntesis de cDNA.

A partir de estos cDNA, se realizó RT-PCR para IL-1 β , TNF, e IL-6, en una solución MAsterMix 2X de Thermo (#K0171), utilizando los siguientes oligonucleótidos (Tabla 9), reactivos y condiciones de amplificación (Tabla 10).

Nombre	Sentido	Anti-sentido
IL-1 β	5' GTCATTCGCTCCCACATTCT 3'	5'ACTTCTTGCCCCCTTTGAAT 3'
IL-6	5'TGTGAAAGCAGCAAAGAGGCACTG 3'	5' ACAGCTCTGGCTTGTTCTCACTA 3'
TNF	5'CAGAGGGAAGAGTTCCCCAGGGACC 3'	5' CCTTGGTCTGGTAGGAGACGG 3'
BactH	5' AGGATCTTCATGAGGTAGT 3'	5' GCTCCGGCATGTGCAA 3'

Tabla 9. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados en RT-PCR.

Reactivo	Cantidad (μ L)
Dream Taq	5
Oligonucleótido fw	1
Oligonucleotido r	1
H ₂ O	1
cDNA	2

Tabla 10. Reactivos y cantidad utilizadas para realizar el RT- PCR.

La amplificación por PCR se realizó bajo las condiciones descritas abajo (Tabla 11).

Temperatura (°C)	Tiempo
95	5min
95	30 segundos
60	30 segundos
72	1 min
72	10 min
10	infinito

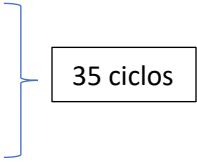


Tabla 11. Condiciones de amplificación para el PCR de IL-1 β , TNF e IL-6.

Finalmente los productos obtenidos de la amplificación fueron separados en un gel de agarosa al 1.7%, y analizados en U.V.

6.8. DETECCIÓN DE LA INFECCIÓN POR RT-PCR.

Para determinar la infección de células THP-1 por virus dengue, se utilizaron los cDNA obtenidos en la sección anterior y se procedió a realizar un PCR anidado. En las siguientes Tablas se indican las secuencias de los oligonucleótidos (Tabla 12) que fueron proporcionados por el grupo del Dr. Humberto Lanz del Centro de Investigación Sobre Enfermedades Infecciosas del Instituto Nacional de Salud Pública (INSP), así como los reactivos y condiciones de termociclado (Tabla 13).

Nombre	Secuencia
DENV ALL RV	5' CCCCATCTATTCAGAATCCCTGC 3'
DENV ALL F	5' CAATATGCTGAAACGAGAGAGAA 3'
DENV 2RV	5' TGCTGTTGGTGGGATTGTTA 3'

Tabla 12. Secuencia de oligonucleótidos utilizados en la determinación de infección por DENV-2 en células THP-1 diferenciadas.

Para este análisis se realizó un PCR anidado (nested PCR), que va dirigido al gen de prM. Este consiste en dos reacciones en la primera amplificación se utilizaron los oligonucleótidos DENV ALL RV Y DENV ALL F donde el primer amplicon es de 177 pbs. Para la segunda amplificación se utilizaron los oligonucleótidos DENV 2RV y DENV ALL F donde el tamaño del amplicon es de 140pbs.

Temperatura(°C)	Tiempo
94	2min
95	30 seg
60	30 seg
72	1 min
72	10 min
10	infinito

} 35 ciclos

Tabla 13. Condiciones de amplificación para determinar infección POR DENV-2.

Los productos fueron revelados en un gel de agarosa al 2%.

6.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Para cada ensayo se cuentan con al menos 4 repeticiones. El análisis estadístico se realizó con el programa Graph Pad Prism 6. Se realizó la prueba t test y se considera que la prueba es significativa para un $P < 0.05$.

7. RESULTADOS.

7.1. INFECCIÓN DE CÉLULAS THP-1 POR DENV2.

Con la finalidad de confirmar que el nuevo stock viral, obtenido por el Dr. Javier Serrato, tiene la capacidad de infectar las células THP-1, se evaluó la expresión del ARN viral en células infectadas a MOI=1, a las 24, 48 y 72 horas post infección. Como se puede observar en la Figura 8, pudimos demostrar que desde las 24 horas y hasta el final del tiempo del estudio se detectó el ARN viral. Sin embargo, hay que hacer notar que al tiempo de 72 horas parece haber una reducción en la cantidad de ARN. También resulta importante mencionar que en este caso solo se revelaron las muestras obtenidas de la segunda amplificación donde se amplificó solo un fragmento del gen de prM de aproximadamente 140pb, que corresponden a lo observado en la Figura 8.

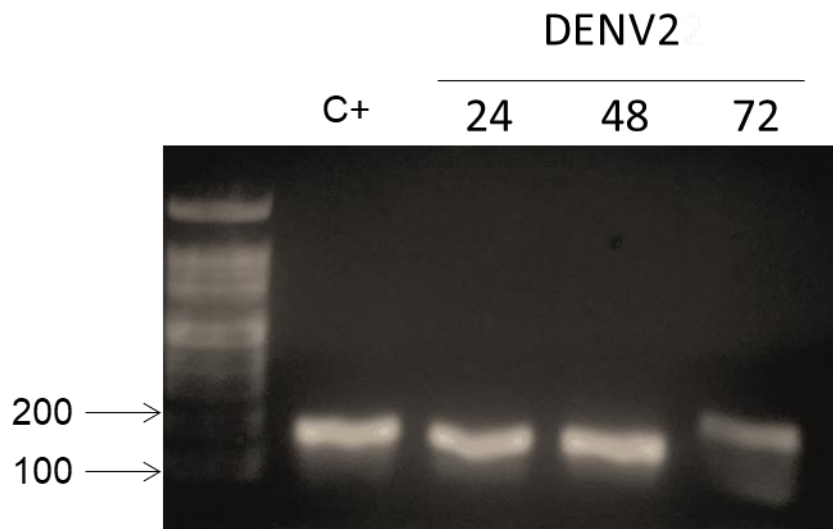


Figura 7. Expresión del RNA viral a diferentes tiempos de infección. Las células THP-1 infectadas a los tiempos 24, 48 y 72 por DENV fueron utilizadas para realizar RT-PCR. Como control positivo (C+) se utilizó el plásmido, con un inserto de DENV-2 con de 6×10^8 copias de genoma viral por mililitro, donado por el Dr. Humberto Lanz Mendoza del CISEI-INSP.

7.2. EXPRESIÓN DE RNA PARA IL-1 β , IL-6 Y TNF EN CÉLULAS INFECTADAS POR DENV2.

Con la finalidad de establecer si DENV2 puede por sí mismo inducir la expresión de citocinas pro-inflamatorias realizamos la infección de THP-1, con una relación de 1 virus por cada célula (MOI=1). Después de 24, 48 y 72 horas de la infección, se obtuvo el ARN total y se realizó RT-PCR para evaluar la expresión de IL-1 β , IL-6, TNF y, como control de amplificación β -actina. En la Figura 8 se presenta una imagen representativa de los resultados obtenidos. Además, también se trataron células con 10 ng/mL de LPS durante los mismos tiempos ya que éste estímulo, se sabe, induce la producción de las citocinas estudiadas.

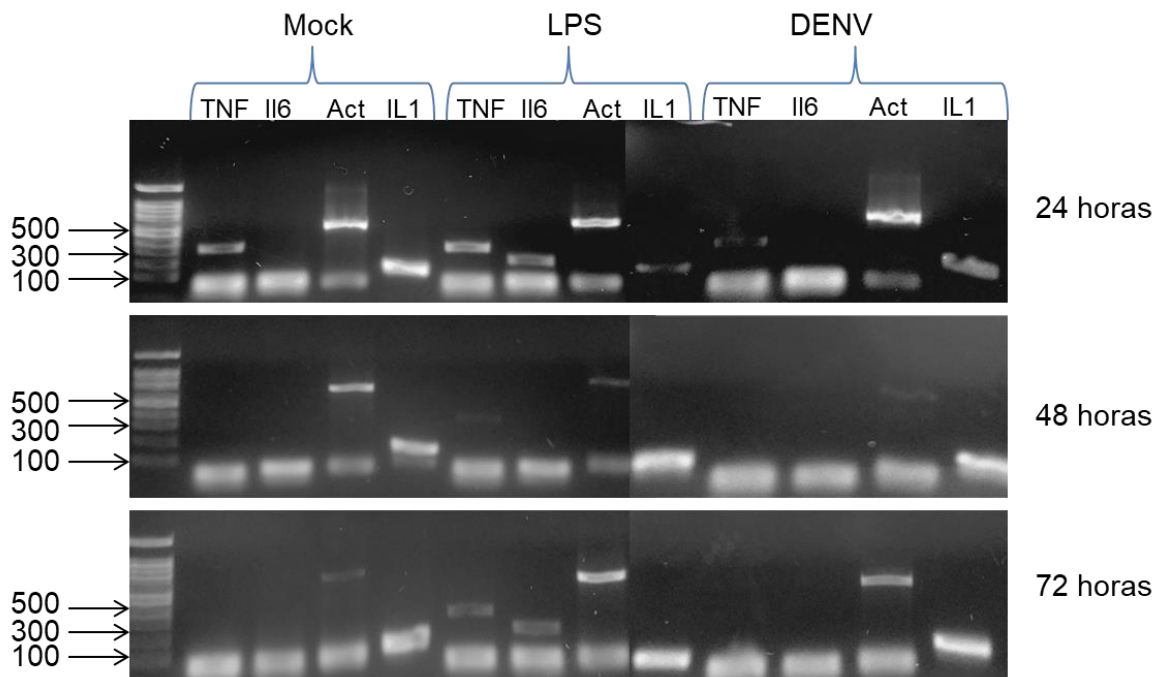


Figura 8. Análisis de los productos obtenidos de RT-PCR, para determinar la expresión de TNF, IL-1 β e IL-6, a las 24,48 y 72 horas post tratamiento con LPS o infección. Las células sin estímulo se trataron solamente con PBS (Mock).

7.2.1. NIVEL DE EXPRESIÓN DE β -ACTINA.

La β -actina fue utilizada como control interno, siendo un gen de mantenimiento para normalizar la expresión de los genes de interés, en la Figura 9 se muestra la expresión de esta, en las diferentes muestras y tiempos, donde se observa una variación en la expresión del gen de β -actina.

La expresión en las condiciones “mock” de β -actina tuvo una variación siendo a las 24 horas su mayor nivel de expresión, a partir de las 48 se observó una disminución en la expresión del gen de β -actina, y a las 72 horas se observó una disminución aún mayor. La expresión de β -actina en el tratamiento con LPS muestra de igual manera una variación en los diferentes tiempos, teniendo valores más altos a las 24 y 72 horas. Con respecto a las células infectadas con DENV-2, a las 24 horas se observa un mayor nivel de expresión con respecto a las 48 horas donde el nivel de expresión tiene una caída y a las 72 horas vuelve a aumentar. En base a estos resultados, se puede decir que técnicamente hubo diferencias importantes durante el curso del experimento, que dificulta el poder dar una conclusión definitiva.

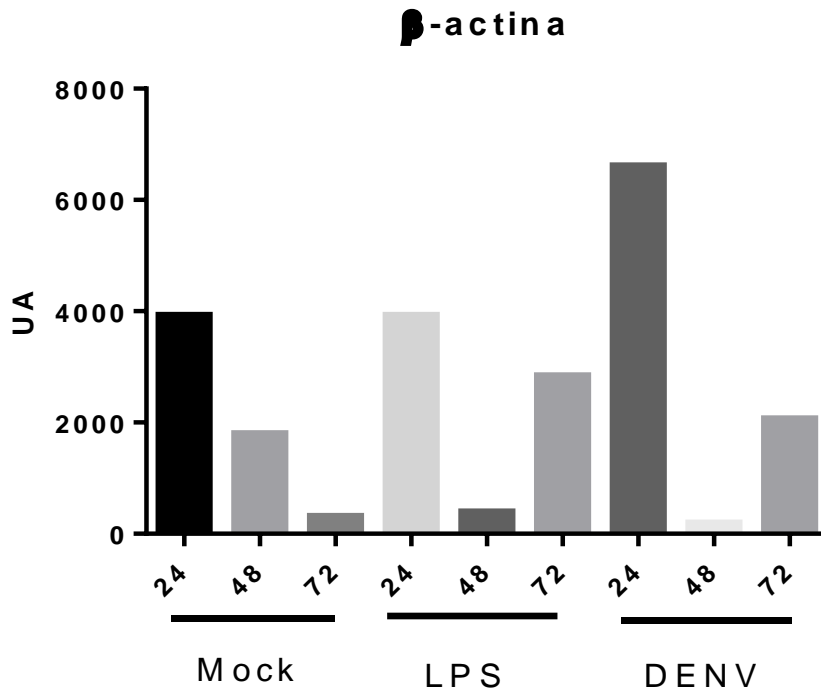


Figura 9. Gráfica de expresión de β -actina en las diferentes muestras y tiempos en que se realizó en el ensayo.

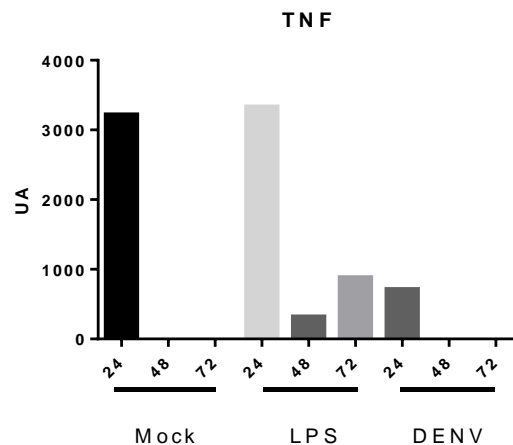
7.2.2. EXPRESIÓN DE TNF Y NORMALIZACIÓN DE TNF/ β -ACTINA.

En la Figura 10, se muestra los niveles comparativos de expresión para TNF para los 3 diferentes tiempos y 3 diferentes tratamientos. En la Figura 10A se observan la intensidad de pixeles correspondiente a cada banda, mientras que en la Figura 10B se observan el ajuste por su relación con los niveles de intensidad de la banda de β -actina. Consideramos que esta manera de presentar los resultados permitía dar una visión más clara acerca de los resultados que podían ser más relevantes, en base a su presencia visual.

De esa manera, podemos observar que la condiciones control (“mock”) parece no inducir ningún tipo de expresión para TNF a los tiempos 48 y 72 hrs. Sin embargo, al tiempo 24 hrs, paradójicamente se observa una banda intensa para el fragmento amplificado del gen de TNF, que incluso por ajuste con el nivel de β -actina no pudo disminuir. Para este resultado no podemos dar una explicación biológica que el hecho de que hubo un error en la técnica.

Por otro lado, para el tratamiento con LPS se puede observar la presencia de expresión de TNF a los 3 diferentes tiempos de incubación, siendo mucho mayor al tiempo más corto. Al observar la Figura 10A, parece sugerir que el nivel de expresión de ser muy alto, a las 24 hrs, bajó de manera brusca, a las 48 hrs, y volvió a incrementarse, para las 72 hrs. Sin embargo, cuando se observa los resultados ajustados para β -actina, la historia es un poco diferente, mostrado que los niveles relativos de TNF parecen disminuir gradualmente desde el tiempo 24 hrs hasta llegar a un mínimo a las 72 hrs, como se ha descrito en otros modelos.

Finalmente, para la infección con el virus DENV2 se observó que sólo se indujo la expresión de TNF al tiempo de 24 hrs, presentando un nivel relativamente bajo en intensidad de banda; pero que sin embargo, permaneció incluso después de ajustarlo en base a la intensidad de la banda de β -actina. En base a estos resultados preliminares, se podría decir que la infección por el virus DENV2 ocasionó un efecto de inducción del gen de TNF claramente menor que el inducido por el tratamiento por LPS.



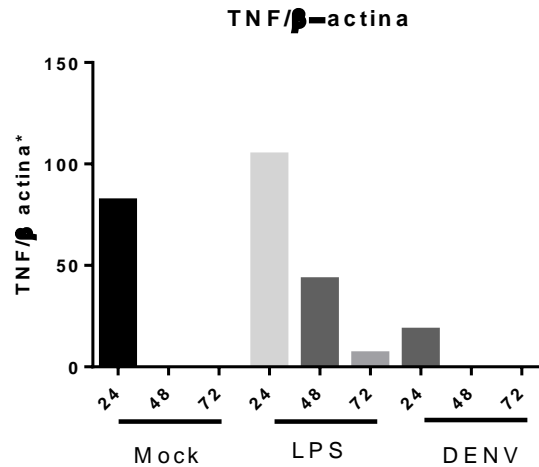


Figura 10. Expresión relativa de TNF en los 3 diferentes tiempos (24, 48 y 72 hrs) y tratamientos (mock, LPS e infección con DENV2). A. Corresponde a comparación simple de los niveles de intensidad de las bandas para el gen de TNF (Figura 8). B. Corresponde a la relación numérica entre la intensidad de las bandas para TNF y la banda de β -actina, para cada tiempo y tratamiento.

Por otra parte, de ser confirmado que las condiciones control (“mock”) de las células THP1 diferenciadas con PMA y evaluadas para la expresión de TNF sigue mostrando un nivel alto de expresión. El nivel bajo de expresión de TNF observado tras 24 hrs de infección por el virus, parecería sugerir que la infección parece, extrañamente, disminuir la inducción basal de TNF. Por eso insistimos que se requiere confirmar estos resultados con nuevos experimentos.

7.2.3. EXPRESIÓN DE IL-6 Y NORMALIZACIÓN DE IL-6/ β -ACTINA.

En el caso de IL-6 observamos en las Figuras 11A y 11B que durante las condiciones control, no se observó ninguna expresión aparente (Figura 8) o detectada por densitometría, lo cual indica que, como se esperaba, se requiere un estímulo para inducir la expresión de IL-6 en este modelo celular *in vitro*.

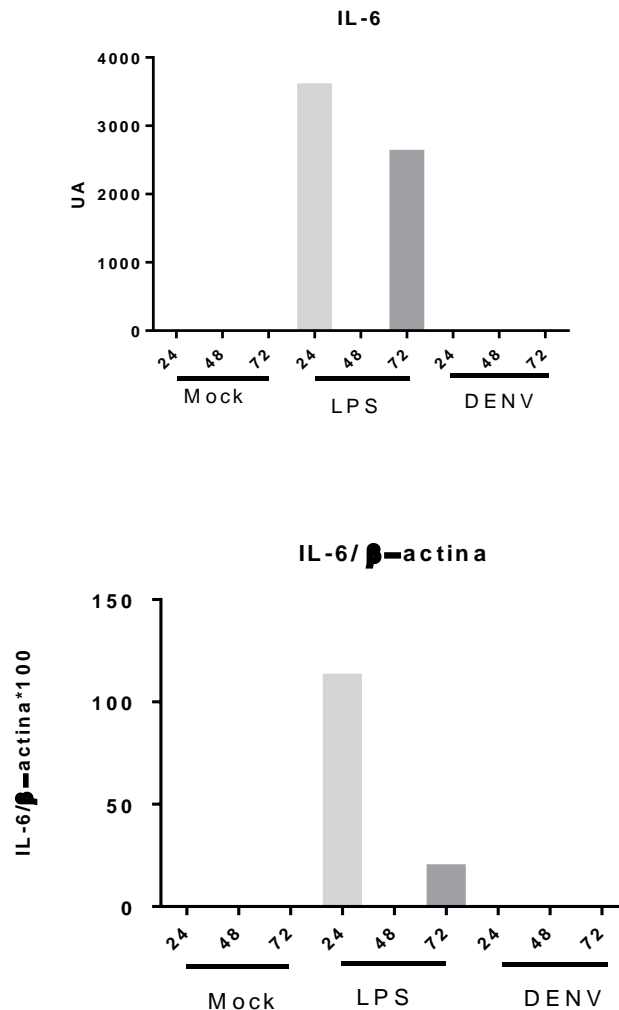


Figura 11. Expresión relativa de IL-6 en los 3 diferentes tiempos (24, 48 y 72 hrs) y tratamientos (mock, LPS e infección con DENV2). A. Corresponde a comparación simple de los niveles de intensidad de las bandas para el gen de IL-6 (Figura 8). B. Corresponde a la relación numérica entre la intensidad de las bandas para IL-6 y la banda de β -actina, para cada tiempo y tratamiento.

Por su parte, el tratamiento con LPS indujo un claro incremento en la expresión de IL-6 a las 24 y 72 hrs; sin embargo, a las 48 hrs no pudimos observar la expresión del fragmento correspondiente. Después de confirmar estos resultados para verificar que no hubo un problema técnico a las 48 hrs y que, por lo tanto, no permitió observar un fragmento amplificado. Pero si aún después de repetir estos experimentos, seguimos observando expresión sólo a los tiempos de 24 y 72 hrs, podría sugerir que la expresión de IL-6 pudiera realizarse en “ciclos”.

Finalmente, en las Figuras 11A y B se observa que ausencia de niveles de expresión detectables (corroborando los resultados de la Figura 8), tanto de manera directa como después de ajustar para los niveles de β -actina. Esto sugiere que la infección por DENV2 parece no ejercer efecto sobre la inducción de este gen, a diferencia del gen de TNF e incluso a tiempo relativamente prolongados post-infección (72 hrs).

7.2.4. EXPRESIÓN DE IL- β Y NORMALIZACIÓN DE IL- β / β -ACTINA.

Como podemos ver en la Figura 12A todas las células en los diferentes tratamientos y tiempos mostraron bandas de expresión para IL-1 β , sin embargo, al ajustar por el nivel de expresión para β -actina, los niveles de expresión relativos disminuyeron.

En las condiciones control (“mock”), las células mostraron amplificación del fragmento correspondiente al gen de IL-1 β (Figura 12A), sin embargo, al momento de ajustar con los niveles de β -actina, los niveles de expresión disminuyeron a niveles basales (Figura 12B), que uno debería esperar en condiciones sin estimulación. Sin embargo, al tiempo de 72 hrs, se observó que el nivel de expresión alto, siendo incluso relativamente mayor que los niveles de expresión por estimulación experimental (LPS o infección viral). A ese respecto, conviene hacer notar que la intensidad del fragmento amplificado para β -actina en condiciones control y a las 72 hrs, fue muy baja en comparación con las bandas de β -actina con los otros tratamientos (Figura 8) y sin embargo, la banda para IL-1 β para los tiempos 24 y 48 hrs, fue similar al tiempo de 72 hrs (Figura 12A). Todo eso, nos permitiría

sugerir que quizás hubo un problema técnico con la banda de β -actina en este tratamiento y tiempo y, potencialmente, podría generar resultados erróneos. Sin embargo, la única manera de confirmarlo es repetir este experimento.

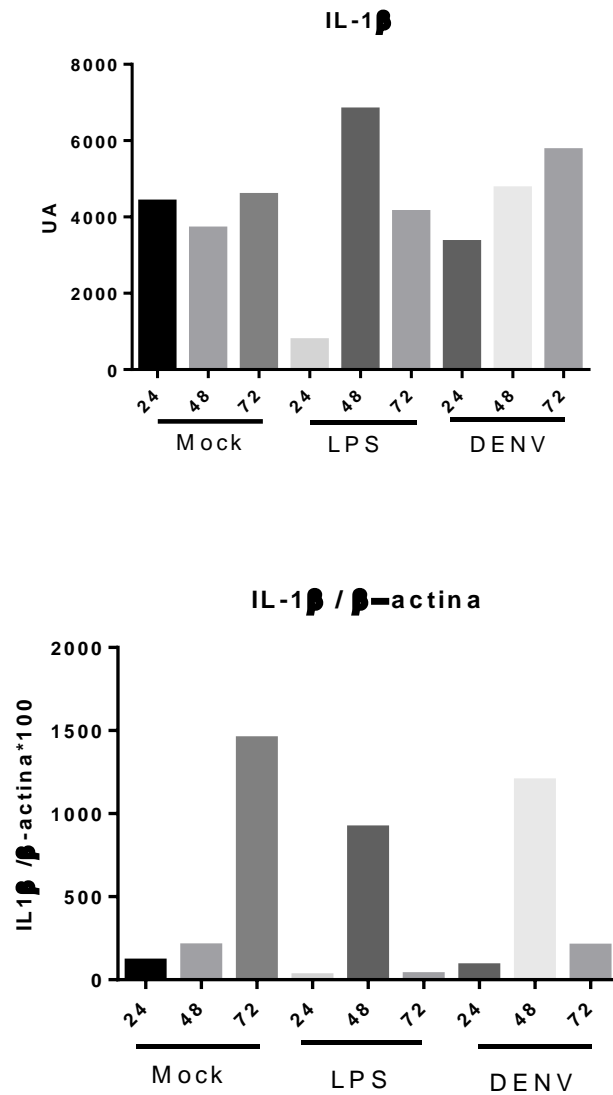


Figura 12. Expresión relativa de IL-1 β en los 3 diferentes tiempos (24, 48 y 72 hrs) y tratamientos (mock, LPS e infección con DENV2). A. Corresponde a comparación simple de los niveles de intensidad de las bandas para el gen de IL- β (Figura 8). B. Corresponde a la relación numérica entre la intensidad de las bandas para IL-1 β y la banda de β -actina, para cada tiempo y tratamiento.

Por el otro lado, el tratamiento con LPS indujo la expresión de IL-1 β fundamentalmente a los tiempos de 48 y 72 hrs. Aunque se observó una débil banda al tiempo de 24 hrs, su ajuste en base al nivel de β -actina, disminuyó a nivel bajo la posible expresión de IL-1 β . Por su parte, en términos generales, estos resultados parecen sugerir que la incubación con LPS ocasionó un incremento de la citocina al tiempo de 48 hrs y desciende a las 72 hrs.

Finalmente, la infección por el virus DENV2 parece mostrar un efecto similar al observado para LPS: amplificación de fragmento a todos los tiempos, pero su ajuste en base a la intensidad de la banda de β -actina, los niveles de expresión a 24 y 72 hrs, disminuyeron, mientras que el máximo de expresión fue a las 48 hrs.

7.3. CUANTIFICACIÓN DE LA SECRECIÓN DE IL-1 β , IL-6 Y TNF.

En varios estudios de otros grupos se ha observado que las citocinas como IL-1 β , IL-6 y TNF juegan un papel importante en el desarrollo de la enfermedad causada por el virus dengue, ya que el desequilibrio en la secreción de estas citocinas podría inducir una respuesta exacerbada, lo cual desencadenaría una respuesta inflamatoria elevada y en algunos casos la permeabilidad plasmática que son los síntomas más graves de la enfermedad. Sin embargo, no está claro el papel del virus dengue en la inducción o control de la producción de estas citocinas.

Dicho esto, se procedió a evaluar el comportamiento de secreción de IL-1 β , IL-6 y TNF en los sobrenadantes de células THP-1 diferenciadas a macrófago e infectadas con DENV2-. También se estudiaron los sobrenadantes de células THP-1 diferenciadas estimuladas con LPS, ya que se sabe que funciona como un inductor de expresión y secreción de las citocinas pro inflamatorias que estudiamos.

7.3.1. NIVELES DE SECRECIÓN DE IL-6.

La determinación de la cinética de secreción de esta citocina se realizó a las 24, 48, 72 y 96 horas post infección, para lo cual se empleó la técnica de ELISA. En la

Figura 13 se muestra el análisis de nuestros datos obtenidos en los ensayos, donde podemos observar que no hay diferencia significativa entre los diferentes tiempos de infección. Sin embargo, podemos observar que sí hay diferencia significativa entre las células sin tratamiento (concentración 14.93 y desviación estándar 1.61), y células infectadas a las 72 (concentración 17.32 y desviación estándar 0.54), y 96 horas (concentración 18.51 y desviación estándar 2.50), sugiriendo que la secreción de esta molécula podría ser tardía. Así mismo, el control con LPS también mostró un incremento significativo en la secreción de esta citocina (concentración 18.68 y una desviación estándar 0.60), a las 24 horas después del estímulo. Se sabe que LPS es un buen inductor de citocinas pro-inflamatorias.

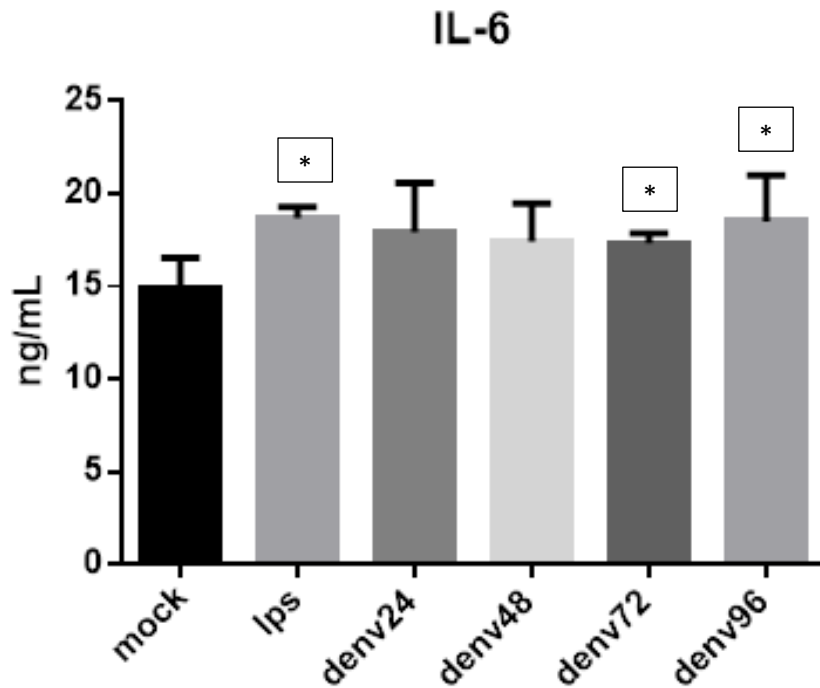


Figura 13. Determinación de los niveles de IL-6 secretada en células tratadas con LPS o infectadas con DENV durante 24, 48, 72 y 96. Como se describe en Material y Métodos, células THP1 diferenciadas fueron incubadas con LPS, con medio solo (Mock) o infectadas con DENV2 por 24, 48, 72 o 96 hrs. Al término de los tiempos de incubación, los sobrenadantes fueron recuperados y los niveles de IL-6 fueron determinados por la técnica de ELISA. Resultados de # ensayos independientes.* $p > 0.05$ respecto al mock.

7.3.2. NIVELES DE SECRECIÓN DE IL-1 β .

En la Figura 14 se muestran los resultados para la cinética de secreción de IL-1 β por efecto de la infección viral. En primer lugar, los niveles de la citocina en células control fue en promedio 1.94 y desviación estándar 0.796. Al comparar el efecto del tiempo de infección sobre los niveles de la citocinas, se puede observar que no hubo diferencia significativa de la concentración de IL-1 β entre las diferentes horas de infección de las células tipo macrófagos. De igual manera, tampoco hubo diferencia significativa entre las células sin tratamiento y aquellos infectados. Aunque se observa una mayor producción de IL-1 β a las 24 y 48 horas, los resultados no fueron estadísticamente significativos. Este resultado parece responder al hecho de observar una gran variación en los resultados de cada ensayo y, por lo tanto, las desviaciones estándar fueron muy grandes. Aunque en nivel promedio de IL-1 β fue mayor de 10 pg/mL, la desviación estándar fue enorme, lo que sugiere que la variación experimental fue tan grande que en un ensayo se observaron niveles cercanos a 20 pg/mL, mientras que en otro, los niveles fueron cercanos a cero. Por lo tanto, anulando la credibilidad de los resultados para este ensayo.

Por su parte, las células tratadas con LPS liberaron más de 20 pg/mL de IL-1 β a las 24 horas de estimulación y aunque también se observó una variación importante entre los diferentes experimentos, se pudo alcanzar una diferencia significativa entre las células estimuladas y aquellas que sólo tuvieron medio de cultivo. Estos resultados sugieren que las células respondieron correctamente a la estimulación por LPS.

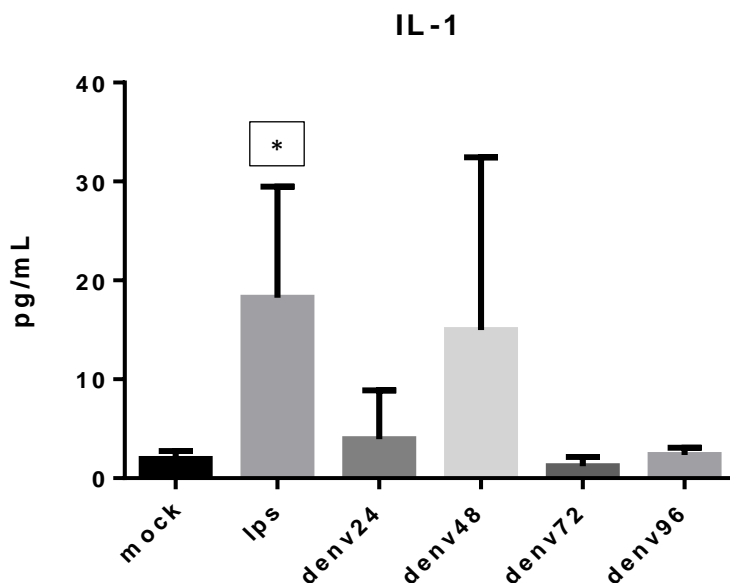


Figura 14. Determinación de los niveles de IL-1 β secretada en células tratadas con LPS o infectadas con DENV durante 24, 48, 72 y 96. Como se describe en Material y Métodos, células THP1 diferenciadas fueron incubadas con LPS, con medio solo (Mock) o infectadas con DENV2 por 24, 48, 72 o 96 hrs. Al término de los tiempos de incubación, los sobrenadantes fueron recuperados y los niveles de IL-1 β fueron determinados por la técnica de ELISA. Los resultados corresponden a # ensayos independientes. * $p < 0.05\%$.

7.3.3. NIVELES DE SECRECIÓN DE TNF.

La Figura 15 muestra la cinética de secreción a las 24, 48, 72 y 96 horas post-infección de células THP-1, como se observa no hay diferencia significativa entre las concentraciones de TNF a los diferentes tiempo de infección, con respecto a las células sin infectar. En primer lugar la concentración para las células sin infectar fue de 1.47 con una desviación de 2.05. Al hacer la comparación de la concentración de TNF en los diferentes tiempos no hubo diferencia significativa entre ellos, aunque a las 24 y 48 horas se ve un incremento en la producción de TNF no fue estadísticamente significativo. El tratamiento con LPS mostró un incremento significativo de la secreción de TNF liberando 9 ng/ml de TNF a las 24 horas,

indicando nuevamente que las células están respondiendo adecuadamente a los estímulos.

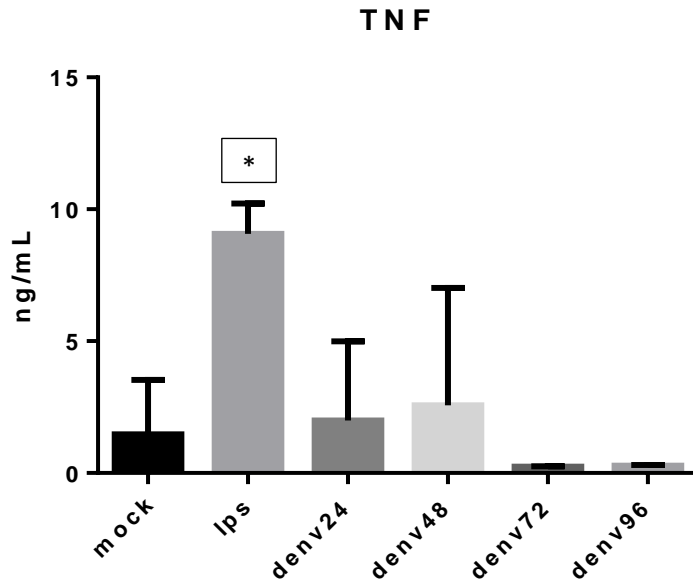


Figura 15. Determinación de los niveles de TNF secretada en células tratadas con LPS o infectadas con DENV durante 24, 48, 72 y 96. Como se describe en Material y Métodos, células THP1 diferenciadas fueron incubadas con LPS, con medio solo (Mock) o infectadas con DENV2 por 24, 48, 72 o 96 hrs. Al término de los tiempos de incubación, los sobrenadantes fueron recuperados y los niveles de TNF fueron determinados por la técnica de ELISA. Resultados de # ensayos independientes.* $p > 0.05$ respecto al mock.

8. DISCUSIÓN.

Varios estudios han mostrado que los pacientes con Dengue presentan concentraciones muy diferentes de diversas citocinas, sugiriendo que este perfil de mensajeros inmunológicos podría ser importante en el desarrollo de las formas severas de la enfermedad. El problema para la interpretación y comparación de estos estudios es que existen muchas variables no controlables, por ejemplo, no se cuenta con indicadores objetivos que permitan asegurar el momento en que inicia la infección, puesto que fundamentalmente depende de una valoración subjetiva del paciente y frecuentemente, la asistencia del paciente con el médico se va a modificar en base al nivel de síntomas. Por su parte, las muestras séricas a los diferentes días de la infección, se modificarán en base a la fecha que el paciente considera como el inicio de la infección. Por otro lado, también se puede observar diferencias entre los estudios dado que en algunos casos, se evalúa plasma (Patro,A et al 2019), y en otros suero (Felipe C, 2016, y Restrepo N, 2008), de pacientes. Al tiempo, los grupos de pacientes también varían mucho en términos de edad: estudios con niños (Berta N, 2008) o con pacientes adultos (Schindler R, 1990).

Una forma de limitar estas variables, son los estudios *in vitro*, ya que se puede controlar el tiempo que transcurre entre la infección y el momento en que se hace el análisis, el serotipo del virus, la concentración viral, como algunos ejemplos; sin embargo, también tienen muchas limitaciones, principalmente porque generalmente se estudia solo un tipo celular y no se toman en cuenta factores producidos por otras células, como pueden ser anticuerpos.

Los trabajos de Chen, 2002; Miranda 2009; Cheung, 2018; Mangione, 2014; Sehrawa, 2018; Rathakrishnan, 2012; Bozza, 2008; Rachman, 2006; Malavige, 2012; Fernando. 2014; Masood, 2018 entre otros muchos, han estudiado la expresión y secreción de citocinas en macrófagos infectados por virus Dengue, pero en general reportan una sola citocina por estudio, o bien, sólo realizan estudios de expresión, pero no de secreción. Dado que la gran mayoría de los investigadores estudian lo que ocurre en el primer día post-infección, es que nosotros quisimos

evaluar la expresión y secreción de estas 3 citocinas que han sido implicadas en la severidad de la enfermedad: IL-1 β , IL-6 y TNF, desde las 24 horas y hasta las 72 horas post-infección.

En términos del experimento de expresión relativa de las tres citocinas, los resultados mostrados en este estudio permiten sugerir que la infección por el virus DENV2 parecen inducir la expresión de IL-1 β a los tiempos evaluados, pero siendo superior al tiempo de 48 hrs. Sin embargo, los niveles de la citocinas en el sobrenadante de cultivo fueron tan variables que no permitieron demostrar ningún cambio, en comparación con las condiciones control (“mock”) y, por lo tanto, no contamos con resultados que puedan reforzar nuestra propuesta de que los niveles de expresión de IL-1 β puedan incrementarse como resultado de la infección viral. Hay que hacer notar, que esto no quiere decir que no hayamos observado IL-1 β en el sobrenadante de cultivo, sino que los resultados de los 3 experimentos realizados fueron tan diferentes que la desviación estándar fue tan elevada que impidió alcanzar una conclusión. En ese sentido, sería deseable revisar la técnica del ELISA para IL-1 β para mejorar su estandarización técnica y, por ende, mejorar la reproducibilidad de los resultados.

Por otra parte, nuestros experimentos no permitieron evidenciar efecto de la infección viral sobre los niveles de expresión de IL-6. Sin embargo, paradójicamente, la determinación de los niveles de IL-6 fueron significativamente superiores al control, para los tiempos de 48 y 72 hrs post-infección. Estos resultados tan contrarios sólo podrán ser confirmados al repetir, nuevamente, los experimentos, porque no sería posible no detectar expresión de la citocina, por un lado, y observar su secreción a los mismos tiempos de evaluación.

Finalmente, los niveles de expresión y secreción al sobrenadante de cultivo de TNF fueron bajos, incluso en algunos casos menores a la condición control (ver Figuras 8 y 10). Asimismo, también tuvimos problemas técnicos que ocasionaron variación en los resultados de la determinación de la citocina por ELISA, por lo que, sobre todo a tiempo menores (<72 hrs), aunque los niveles promedio fueron

mayores que el control, la desviación estándar impidió confirmarlo de manera estadística.

Una posible explicación de la razón por la cual obtuvimos valores diferentes a los que ya habíamos reportado en estudios anteriores, incluso en nuestro laboratorio, es que utilizamos un nuevo stock viral, que potencialmente haya podido generar efectos diferentes en las células. Si bien, utilizamos el mismo tipo de virus Dengue 2 Nueva Guinea, de serotipo 2, el virus que utilizamos se amplificó en células, C6/36 (células de mosco) mientras que en el trabajo de Flores Ávila Karina fue virus que se expandió en cerebro de ratón. El trabajo de Callaway y cols, (Callaway, 2015) muestra que la presencia de moléculas secretadas por las células donde se expanden los virus, pueden influir en las respuestas de los macrófagos, dando resultados variables incluso si es un mismo tipo celular (en su trabajo son células Vero, de dos diferentes lotes). Por otro lado, Dejnirattisai y cols, en el 2011, reportaron que la glicosilación del virión de dengue es diferente si proviene de células de mosquito o de células dendríticas, de forma tal que DENV obtenido de células de C6/33 mosquito infectan células dendríticas y células Vero de mamífero, sin embargo, los virus obtenidos de células dendríticas son incapaces de infectar células con DC-SIGN (CD209) pero mantienen la capacidad de infectar células L-SIGN positivas.

Así mismo, las diferencias también pueden provenir de la variación de las células THP-1 y el protocolo de diferenciación. Park y cols., en el 2007, mostraron evidencia de que el protocolo de diferenciación de las células THP-1 tiene una gran influencia en las respuestas a estímulos, como el LPS, y el resultado de la secreción de citocinas o fagocitosis. Nosotros seguimos el mismo protocolo que se ha usado por años en el laboratorio, para evitar que esto sea una causa de variación en los resultados. Sin embargo, de acuerdo a lo que propone Park, nuestras células se comportaron como se espera, ya que la diferenciación con 10 nM de PMA permite que estas células respondan con la secreción de IL-1 β , TNF e IL-6 en respuesta a 10 ng/mL de LPS. Sin embargo, nos sorprendieron los resultados con la infección

por el virus Dengue, ya que si bien hubo una infección exitosa, la secreción de IL-1 β y TNF fue baja, contrario a lo que se esperaba.

En las condiciones que se desarrollaron los ensayos en este trabajo, el virus dengue no parece ser un fuerte inductor de respuesta inflamatoria, ni por cambios en la expresión del mensajero, ni en las proteínas secretadas. Sin embargo, se requiere repetir los ensayos pues la variación obtenida es muy grande, tal vez por problemas con las células o la incubadora.

9. CONCLUSIÓN.

Los resultados obtenidos bajo las condiciones de ensayo de este trabajo nos permiten rechazar la hipótesis de que el virus dengue inducirá de manera secuencial y temporal la secreción de TNF, IL- β e IL-6. Al contrario, el virus resultó ser un estímulo pro-inflamatorio débil. Sin embargo, las dificultades técnicas hacen que se requiera confirmar esta conclusión.

10. PERSPECTIVAS.

- Determinar el papel de la expansión del virus DENV en células C6/36, sobre la capacidad de inducir una respuesta inflamatoria en macrófagos.
- Repetir la cinética de expresión y de secreción, para IL-1 β , IL-6 y TNF pero con condiciones más controladas.
- Realizar la cinética de expresión de las citocinas, hasta las 96 horas post-infección.

11. BIBLIOGRAFÍA.

Acosta C, Gómez I. (2005). Biología y métodos de diagnósticos del dengue. *Rev Biomed.* 4(9).113-137.

Al-Sadi R, Ye D, Dokladny K, Ma TY. Mechanism of IL-1beta-induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability. *J Immunol.* 180(8):5653-61.

Araujo F, Brilhante RS, Cavalcanti LP, Rocha MF, Cordeiro RA, Perdigao AC, et al. (2011) Detection of the dengue non-structural 1 antigen in cerebral spinal fluid samples using a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay. *J Virol Methods* 59(3). 128-31.

Bandyopadhyay S, Lum LC, Kroeger A. (2006) Classifying dengue: a review of the difficulties in using the WHO case classification for dengue haemorrhagic fever. *Tropical medicine & international health* 10 (2).1238-55

Beita J, Salazar N, Valverde M. (2016). Patogénesis de la enfermedad por virus del dengue. *Revista Clínica de la Escuela de Medicina UCR.* 4(10). 120-129.

Bethell D, Flobbe K, Cao Xuan, Thanh Phuong, Nicholas P. J. Day, Pham Tung Phuong, Wim A. Buurman, M. J. Cardosa, Nicholas J. White, Dominic Kwiatkowski. (1998) Pathophysiologic and Prognostic Role of Cytokines in Dengue Hemorrhagic Fever, *The Journal of Infectious Diseases.* 4(3) 778–782.

Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL et al. (2013). The global distribution and burden of dengue. *Nature.*216 (10). 504-507.

Bozza FA, Cruz OG, Zagne SM, Azeredo EL, Nogueira RM, Assis EF, Bozza PT, Kubelka CF (2008) Multiplex cytokine profile from dengue patients: MIP-1beta and IFN-gamma as predictive factors for severity. *BMC Infect Dis.* 25;8:86. doi: 10.1186/1471-2334-8-86.

Brady OJ, Gething PW, Bhatt S, Messina JP, Brownstein JS, Hoen AG et al. (2012). Refining the global spatial limits of dengue virus transmission by evidence-based consensus. *PLoS Negl Trop Dis.* 87(4). 216-224.

Brathwaite Olivia, San Martin J, Montoya R, Betzana J, and Dayan G. (2012). The History of Dengue Outbreaks in the Americas. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 80 (6). 584-593.

Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC. (1997). Respuestas celulares al interferón- γ *Annu Rev Immunol.* 1. 749–95.

Butthep P, Chunchakan S, Yoksan S, et al. (2012). Alteration of cytokines and chemokines during febrile episodes associated with endothelial cell damage and plasma leakage in dengue hemorrhagic fever. *Pediatr Infect Dis J.* 87(4) 232–238.

Callaway JB, Smith SA, Widman DG, McKinnon KP, Scholle F, Sempowski GD, Dittmer DP, Crowe JE Jr, de Silva AM, Ting JP (2015) Source and Purity of Dengue-Viral Preparations Impact Requirement for Enhancing Antibody to Induce Elevated IL-1 β Secretion: A Primary Human Monocyte Model. *PLoS One.* 10(8):e0136708. doi: 10.1371/journal.pone.0136708.

Campos de Melo LF Sérgio Caldas, Myrian Morato Duarte, Ana Luisa Furtado Cury, Alzira Batista Cecílio, Pedro Augusto Carvalho Costa, Lis R. Antonelli, and Kenneth

J. Gollob. (2016). Dengue Patients with Early Hemorrhagic Manifestations Lose Coordinate Expression of the Anti-Inflammatory Cytokine IL-10 with the Inflammatory Cytokines IL-6 and IL-8. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 59(3)193-200.

Castillo J, Naranko J, & Rojas M. (2018). Role of Monocytes in the Pathogenesis of Dengue. *Hirschfeld Institute of Immunology and Experimental Therapy.* 89(5) 27-40.

Castro M, Marchain C, & Loreño M. (2013). Respuesta inmune e inmunopatogénesis en las infecciones. *Gaceta Médica de México.* 4(2) 531-540.

Catteau A, Kalinina O, Wagner MC, Deubel V, Courageot MP, Desprès P (2003) Dengue virus M protein contains a proapoptotic sequence referred to as ApoptoM. *J Gen Virol.* 84(Pt 10):2781-2793.

Chaturvedi UC, Agarwal R, Elbishbishi EA, Mustafa AS. (2000). Cytokine cascade in dengue hemorrhagic fever: implications for pathogenesis. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 14 (4) 183-8.

Chen HL, Lin SR, Liu HF, King CC, Hsieh SC, Wang WK. (2008). Evolution of dengue virus type 2 during two consecutive outbreaks with an increase in severity in southern Taiwan in 2001-2002. *Am J Trop Med Hyg.* 12 (3) 495-505.

Chen YC, Wang SY (2002) Activation of terminally differentiated human monocytes / macrophages by dengue virus: productive infection, hierarchical production of innate cytokines and chemokines, and the synergistic effect of lipopolysaccharide. *J Virol.* 26 (5) 9877–9887.

Cheung KT, Sze DM, Chan KH, Leung PH (2018) Involvement of caspase-4 in IL-1 beta production and pyroptosis in human macrophages during dengue virus infection. *Immunobiology*. 223(4-5):356-364. doi: 10.1016/j.imbio.2017.10.044.

Corrales E, y Hun L. (2012). New Perspectives on Dengue Pathogenesis. *Acta Médica Costarricense*. 19(5) 75-85.

De Alwis, R., Williams, KL, Schmid, MA, Lai, CY, Patel, B., Smith, SA, de Silva, AM (2014). Los virus del dengue son potenciados por poblaciones distintas de anticuerpos de reacción cruzada de serotipo en sueros inmunes humanos. *Patógenos PLoS*. 70(1) 204-209.

Dejnirattisai W, Webb AI, Chan V, Jumnainsong A, Davidson A, Mongkolsapaya J, Screaton G (2011) Lectin switching during dengue virus infection. *J Infect Dis*. 203(12):1775-83

Dimitriou ID, Clemenza L, Scotter AJ, Chen G, Guerra FM, Rottapel R (2008). Putting out the fire: coordinated suppression of the innate and adaptive immune systems by SOCS1 and SOCS3 proteins. *Immunol Rev* 224:265-83.

Eppy, S, Nainggolan L, Rumende CM (2016). The Differences Between Interleukin-6 and C-reactive Protein Levels Among Adult Patients of Dengue Infection with and without Plasma Leakage. *Acta Med Indones*. 48(1):3-9.

Espina LM, Valero NJ, Hernández JM et al (2003). Increased apoptosis and expression of tumor necrosis factor-alpha caused by infection of cultured human monocytes with dengue virus. *Am J Trop Med Hyg*, 48–53.

Fernando, MR, Reyes, J, Iannuzzi, J., Leung, G., & McKay, D. M. (2014). The pro-inflammatory cytokine, interleukin-6, enhances the polarization of alternatively activated macrophages. *PLoS ONE*.273. 109-116.

Fink J, Gu F, Vasudevan SG. (2006). Papel de las células T, citoquinas y anticuerpos en el dengue y el dengue hemorrágico. *Rev Med Virol*. 60(2). 263-75.

Flores Avila K (2013) Estudio del papel de IgG1 en la liberación de citosinas por el macrófago en la infección por Dengue. Tesis de Maestría. UAEM

Flores L, Estrada T., Sedeño-Monge, V., Moreno, M., Manjarrez, M., González-Ochoa, G., Millán-Pérez Peña, L, Reyes-Leyva, J. (2017). IL-10 and socs3 Are Predictive Biomarkers of Dengue Hemorrhagic Fever. *Mediators Inflamm* 2017:5197592. doi: 10.1155/2017/5197592.109(4) 20-28.

Friberg H. (2018). Protective versus pathologic pre-exposure. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 280: 110-115.

Gabay C. (2006). Interleukin-6 and chronic inflammation. *Biomed*.14(5): 15-20

Ginhoux F., Greter M., Leboeuf M., et al. (2010). El análisis del mapeo del destino revela que la microglía adulta se deriva de macrófagos primitivos. *La ciencia*, 230: 841-845.

GBD (2018) Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017 *Lancet*, 392: 1736-88.

Gubler D, Reed D, Rosen L, Hitchcock JR, Jr. (1978). Epidemiologic, clinical, and virologic observations on dengue in the Kingdom of Tonga. *Am J Trop Med Hyg.* 7(2) 581-89.

Gonzalez J. (2014). El dengue viajero. *Elementos*; 11-16.

Hamidzadeh K., Christensen, SM, Dalby, E., Chandrasekaran, P. y Mosser, DM (2017). Macrophages and the Recovery from Acute and Chronic Inflammation *Annu Rev Physiol* 79:567-592

Hottz E. D., Medeiros I. M., Vieira A., de Assis, E. F., Vals, R., Castro H. C., Bozza, P. T. (2014). Platelet activation and apoptosis modulate monocyte inflammatory responses in dengue. *Journal of immunology*,10(1) 1864–1872.

Hottz, E. D., Lopes, J. F., Freitas, C., Valls-de-Souza, R., Oliveira, M. F., Bozza, M. T., Bozza, P. T. (2013). Platelets mediate increased endothelium permeability in dengue through NLRP3-inflammasome activation. *Blood*.100:3405–3414.

Juffrie M, Meer GM, Hack CE, Haasnoot K, Sutaryo, et al. (2001). Inflammatory mediators in dengue virus infection in children: Interleukin-6 and its relation to C-reactive protein and secretory phospholipase A2. *Am J Trop Med Hyg.*4: 65-70.

Kautner I, Robinson MJ, Kuhnle U. (1997) Dengue virus infection: epidemiology, pathogenesis, clinical presentation, diagnosis, and prevention. *The Journal of pediatrics*.70(6) 516-24.

Kularatne SA, Pathirage MM, Gunasena S (2008). A case series of dengue fever with altered consciousness and electroencephalogram changes in Sri Lanka. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 20(3) 1053-4.

Laredo S, Guo X; Bocanegra V. (2012). Virus del dengue: estructura de serotipos y epidemiología molecular. *Ciencia UAT*.1.27-33.

Lindenbach B, Rice C. (2003). Molecular biology of flaviviruses. *Adv Virus Res*.2(1).23-61.

Lindenbach B, Jurgen H, Rice C. (2007). Flaviviridae: The Viruses and Their Replication. *Fields Virolog*. 30. 1101-1133.

Lee, YH, Leong W.Y and Wilder-Smith. A (2016). Markers of dengue severity: a systematic review of cytokines and chemokines. *J Gen Virol* 97(12):3103-3119.

Malavige GN, Ogg GS (2013) .T cell responses in dengue viral infections. *J Clin Virol*. 58(4):605-11.

Malavige, G. N., & Ogg, G. S. (2017). Pathogenesis of vascular leak in dengue virus infection. *Immunology*, 151(3), 261–269.

Mangione, J. N., Huy, N. T., Lan, N. T., Mbanefo, E. C., Ha, T. T., Bao, L. Q., Nga, C. T., Tuong, V. V., Dat, T. V., Thuy, T. T., Tuan, H. M., Huong, V. T., & Hirayama, K. (2014). The association of cytokines with severe dengue in children. *Tropical medicine and health*, 42(4): 137–144.

Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., & Locati, M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in Immunology*, 25(12), 677-686.

Martina B, Koraka P, Osterhaus A (2009) "Dengue Virus Pathogenesis: an Integrated View," *Clinical Microbiology Reviews*. 22(4):564-581.

Miranda E. (2013). Patogénesis del Dengue. *Horizonte Médico*, 13(3) 47-51.

Masood KI, Jamil B, Rahim M, Islam M, Farhan M, Hasan Z (2018) Role of TNF α , IL-6 and CXCL10 in Dengue disease severity. *Iran J Microbiol*. 10(3):202-207.

Modhiran N, Watterson D, Muller DA, Panetta AK, Sester DP, Liu L, Hume DA, Stacey KJ, Young PR (2015) Dengue virus NS1 protein activates cells via Toll-like receptor and disrupts endothelial cell monolayer integrity. *Sci Transl Med*. 7(304):304ra142.

Mohamed M. 2021, Dengue Bulletin, Volume 41, December 2020. New Delhi: World Health Organization, Regional Office for South-East Asia; 2021. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

Mosser DM, Edwards JP 2008. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol*. 8 (12):958-69.

Mukhopadhyay S., Kuhn, R.J And Rossmann M. G (2005) A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat Rev Microbiol* 3(1):13-22.

Narro J, Gómez H.1995. El dengue en México: un problema prioritario de salud pública. *Salud Pública Mex*. 37. 12-20

Nimmannitya S (1987) Clinical spectrum and management of dengue haemorrhagic fever. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 18(3):392-7

Nimmannitya S. (1999) Dengue hemorrhagic fever: disorders of hemostasis. IXth Congress of the International Society of Haematology Asian-Pacific Division; 1999 Oct 24-28; Bangkok, Thailand.

Ochoa F, Bravo A. (2013). Macrophages, angels or demons. *GAMO*. 12(1):1-3

Organización Panamericana de la Salud / Organización Mundial de la Salud. 2020 Actualización Epidemiológica: Dengue. 7 de febrero de 2020,

Organización Panamericana para la Salud (2016). Dengue guías para la atención de enfermos en la región de las américas.

Organización Panamericana de la Salud (2015). Dengue; Guías para la atención de enfermos en la región de las Américas. 1-144.

Pang T, Cardoso MJ, Guzman MG. (2007) Of cascades and perfect storms: the immunopathogenesis of dengue haemorrhagic fever-dengue shock syndrome (DHF/DSS). *Immunol Cell Biol*. 85 (1):43-5.

Pang, X, Zhang R, Cheng G (2017). Progress towards understanding the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Virologia Sinica*, 32(1):16-22. doi: 10.1007/s12250-016-3855-9

Parisi, L., Gini, E., Baci, D., Tremolati, M., Fanuli, M., Bassani, B., Farronato, G., Bruno, A., & Mortara, L. (2018). Macrophage Polarization in Chronic Inflammatory Diseases: Killers or Builders. *Journal of immunology research*, 2018, 8917804.

Patro ARK, Mohanty S, Prusty BK, Singh DK, Gaikwad S, Saswat T, Chattopadhyay S, Das BK, Tripathy R, Ravindran B (2019) Cytokine Signature Associated with Disease Severity in Dengue. *Viruses*. 11(1):34. <https://doi.org/10.3390/v11010034>

Pizarro D. (2009). Dengue, dengue haemorrhagic fever. *Acta Pediátrica Costarricense*,21(1): 8-17.

Powell P, Castañeda J. (2017). La respuesta inmunológica contra el virus del dengue y la vacunación. *Revista Latinoamericana de Infectología Pediátrica*.3. 102-106.

Qiao Y, Giannopoulou EG, Chan CH, Park SH, Gong S, Chen J, Hu X, Elemento O, Ivashkiv LB (2013). Synergistic activation of inflammatory cytokine genes by interferon- γ -induced chromatin remodeling and toll-like receptor signaling. *Immunity*. 39(3):454-69. doi: 10.1016/j.immuni.2013.08.009.

Rachman A, Rinaldi I. (2006) Coagulopathy in dengue infection and the role of interleukin-6 *Acta Med Indones*, 38(2): 105-108.

Rathakrishnan A, Wang SM, Hu Y, Khan AM, Ponnampalavanar S, et al. (2012) Cytokine Expression Profile of Dengue Patients at Different Phases of Illness. *PLoS ONE* 7(12): e52215. doi:10.1371/journal.pone.0052215.

Restrepo BN, Ramírez R, Agudelo FP, Avendaño E, Chacón JC, Rojas W, Bedoya G (2010). Características clínicas y niveles de citocinas en pacientes con dengue y su relación con la raza. *Revista Biomedica*, 21(3):137-147.

Restrepo BN, D. M. (2008). Serum levels of interleukin-6, tumor necrosis factor-alpha and. *Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*.4. 20-25

Rigau J, Clark GG, Gubler DJ, Reiter P, Sanders EJ, Vorndam AV.(1998) Dengue and dengue haemorrhagic fever. *Lancet*, 352(9132):971-7.

Rodríguez R, Álvarez M, Gritsun T, Halstead S, Kouri G, Gould EA et al. (2005). Virus evolution during a severe dengue epidemic in Cuba, 1997. *Virology*. 2: 154-59.

Rolph M. S., Zaid A., Rulli N. E., Mahalingam S. (2011). Downregulation of interferon-beta in antibody-dependent enhancement of dengue viral infections of human macrophages is dependent on interleukin-6. *The Journal of Infectious Diseases*, 204(3):489-91.

Salles, T.S., da Encarnação Sá-Guimarães, T., de Alvarenga, E.S.L. et al. (2018) History, epidemiology and diagnostics of dengue in the American and Brazilian contexts: a review. *Parasites Vectors* 11: 264 <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2830-8>

Soe, JJ, Khan, AM, Manikam,R , Vanhoutte P and Sekaran S.D (2017). High dengue virus load differentially modulates human microvascular endothelial barrier function during early infection. *Journal of General Virology*,280. 2993-3007.

Secretaria de Salud. (2017). Lineamientos de vacunación contra dengue. Subsecretaria de prevención y promoción de la salud centro nacional para la salud de la infancia y la adolescencia. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/305805/Anexo_1._LINEAMIENTOS_DENGUE_2017.pdf

Secretaria de Salud. (2018). Panorama Epidemiológico de Dengue, 2018. Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud Dirección General de Epidemiología. <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/panorama-epidemiologico-de-dengue-2018>

Secretaria de Salud. (2019). Panorama Epidemiológico de Dengue, 2019. Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud Dirección General de Epidemiología. <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/panorama-epidemiologico-de-dengue-2019>

Secretaria de salud. (2020). Panorama Epidemiológico de Dengue, 2020. Subsecretaria de Prevención y Promoción de la Salud Dirección General de Epidemiología. <https://www.gob.mx/salud/documentos/panorama-epidemiologico-de-dengue-2020>

Secretaria de salud (2021). Panorama Epidemiologico de Dengue, 2021. Dirección de Vigilancia Epidemiológica de Enfermedades Transmisibles. <https://www.gob.mx/salud/documentos/panorama-epidemiologico-de-dengue-2021>

Sehrawat, P., Biswas, A., Kumar, P., Singla, P., Wig, N., Dar, L., y Sood, R. (2018) Role of Cytokines as Molecular Marker of Dengue Severity. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 10(1):e2018023. doi: 10.4084/MJHID.2018.023

Schindler Ralf, J. M. (1990). Correlations and Interactions in the Production of Interleukin-6 (IL-6), IL-1, and Tumor Necrosis Factor (TNF) in Human Blood Mononuclear Cells: IL-6 Suppresses IL-1 and TNF. *The American Society of Hematology*. 30(2). 109-115

Souza T, & ET. (2018). History, epidemiology and diagnostics of dengue in America and a Brazilian context. *Parasites&Vectors*. 31:10-14

Simon, AY, Sutherland M Pryzdial E. (2015). Dengue virus binding and replication by platelets. *Blood*, 126(3): 378-385.

Srikiatkachorn A, Krautrachue A, Ratanaprakarn W, Wongtapradit L, Nithipanya N, Kalayanaroj S, et al. (2007) Natural history of plasma leakage in dengue hemorrhagic fever: a serial ultrasonographic study. *Pediatr Infect Dis J* 26(4):283-90

Suharti C, van Gorp EC, Setiati TE, Dolmans WM, Djokomoeljanto RJ, Hack CE, ten CH. (2002). The role of cytokines in activation of coagulation and fibrinolysis in dengue shock syndrome. *Thromb Haemost*,4. 42-6.

Slavov SN, Cilião-Alves DC, Gonzaga FAC, Moura DR, de Moura ACAM, et al. (2019) Dengue seroprevalence among asymptomatic blood donors during an epidemic outbreak in Central-West Brazil. *PLOS ONE* 14(3)

Torres-Galicia, I, Cortés-Poza, D y Becker I (2014) Dengue en México: análisis de dos décadas *Gaceta Med Mex* 150:122-7

Ubol S, & Halstead S. (2010). How innate immune mechanisms contribute to antibody-enhanced viral infections. *Clinical and vaccine immunology*.21. 1829–1835.

Velandia M, Castellanos J. E. (2011). Virus del dengue: estructura y ciclo viral. *Infectio*, 15(1): 33-43

Verlaeten T, Cabie A, Kaidomar S, Moravie V, Martial J et al. (2008). Influence of the dengue serotype, previous dengue infection, and plasma viral load on clinical presentation and outcome during a dengue-2 and dengue-4 co-epidemic. *Am J Trop Med Hyg*, 78(6):990-8

World Health Organization and Pan American Health Organization. (2013). Guía de Bolsillo; Diagnostico y manejo clínico de casos de dengue, 1-39. https://www.who.int/denguecontrol/Guia_bolsillo.pdf?ua=1

World Health Organization. (2009). Dengue Guidelines for diagnosis, treatment, prevention, and control. https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44188/9789241547871_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y

World Health Organization. (2018). Dengue and severe dengue. https://www.who.int/health-topics/dengue-and-severe-dengue#tab=tab_1

Xing Z, Gauldie J, Cox G, Baumann H, Jordana M, et al. (1998). IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *J Clin Invest*, 101(2): 311–320

88. Yen, Y. T., Chen, H. C., Lin, Y. D., Shieh, C. C., & Wu-Hsieh, B. A. (2008). Enhancement by tumor necrosis factor alpha of dengue virus-induced endothelial cell production of reactive nitrogen and oxygen species is key to hemorrhage development. *Journal of virology*, 82(24), 12312–12324.

Zeng Z, Zhan J, Chen L, Chen H, Cheng S (2021) Global, regional, and national dengue burden from 1990 to 2017: A systematic analysis based on the global burden of disease study 2017. *E Clinical Medicine*. 2021 32:100712.